



Implication des cellules NK au cours des maladies auto-immunes

Baptiste Hervier

► To cite this version:

Baptiste Hervier. Implication des cellules NK au cours des maladies auto-immunes. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066149 . tel-01171508

HAL Id: tel-01171508

<https://theses.hal.science/tel-01171508>

Submitted on 4 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'UNIVERSITE,
UNIVERSITE PIERRE & MARIE CURIE, Paris

Ecole Doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique
Spécialité Immunologie

Présentée par Monsieur Baptiste HERVIER

« *Implication des cellules NK au cours des maladies auto-immunes* »

Soutenance : 2 juillet 2014

Jury composé de

Me Isabelle Cremer,	Professeur, INSERM URMS 1138, UPMC-Paris	Présidente
Me Véronique Braud,	Directrice de Recherche, CNRS-UMRS 7275, Université Nice-Sophia-Antipolis	Rapporteur
Mr Xavier Mariette,	Professeur, Hôpital Kremlin-Bicêtre & INSERM UMRS 1012 APHP & Université Paris-Sud	Rapporteur
Mr Bernard Bonnotte	Professeur, Centre Hospitalier Universitaire & INSERM-UMRS 1098, Université de Dijon	Examineur
Mr Vincent Vieillard,	Directeur de Recherche, INSERM UMRS 1135, UPMC-Paris	Co-directeur
Mr Zahir Amoura,	Professeur, Hôpital Pitié-Salpêtrière & INSERM UMRS 1135, APHP & UPMC-Paris	Co-directeur

Je remercie très sincèrement tous les membres du Jury pour les rôles respectifs qu'ils ont eu dans ce travail et son évaluation.

Je remercie vivement toutes celles et tous ceux qui, de très près ou d'un peu plus loin, scientifiquement, matériellement ou affectivement, récemment ou il y a un peu plus longtemps, ont permis que ce travail aboutisse.

Un grand merci à ceux avec qui j'ai eu au cours de ces années de travail et d'incertitude, des discussions passionnées mais désintéressées sur mes choix et mes orientations.

Carmen, Zacharie, Hadrien et tout bonheur à venir : je n'oublie pas que nous avons tant d'autres histoires à raconter et même à écrire...

« *Scientia et potentia humana in idem coincidunt,
quia ignoratio causæ destituit effectum* »,
« Knowledge is power »
Sir Francis Bacon
in Novum Organum livre 1, aph. 3, w1620.

Sommaire

I.	Introduction	1
1.	Cellules Natural Killer	2
1.1.	Définitions et Caractérisation	2
1.1.1.	Données générales	2
1.1.2.	Sous-populations de cellules NK	2
1.2.	Modes d'activation des cellules NK	3
1.2.1.	Les principaux récepteurs des cellules NK et leurs ligands	5
1.2.1.1.	La superfamille des immunoglobulines	5
1.2.1.1.1.	Les KIRs	5
1.2.1.1.2.	FcγRIIIa (CD16a)	9
1.2.1.1.3.	Les LILR/ILT	9
1.2.1.1.4.	Les NCRs	9
1.2.1.1.5.	DNAM-1 (CD226)	10
1.2.1.2.	La superfamille des Lectines de type C	11
1.2.1.2.1.	Les récepteurs inhibiteurs	11
1.2.1.2.2.	Les récepteurs activateurs	12
1.2.1.3.	Les récepteurs de cytokines, facteurs de croissance et Chimiokines	13
1.2.1.4.	Les récepteurs aux signaux de dangers : les TLRs intracellulaires	14
1.2.1.5.	Autres co-récepteurs et marqueurs d'activation	14
1.2.2.	Acquisition des différents récepteurs au cours de la différenciation et la maturation des cellules NK	15
1.3.	Fonctions des cellules NK	15
1.3.1.	Cytotoxicité	16
1.3.1.1.	Modes de déclenchement de la cytotoxicité	16
1.3.1.2.	Mécanismes effecteurs	18
1.3.2.	Production de chimiokines, cytokines et facteurs de croissance	20
1.3.2.1.	Chimiokines	20
1.3.2.2.	Cytokines	20
1.3.3.	Immunorégulation par les cellules NK	22
1.3.3.1.	Interactions cellules NK - cellules de l'immunité adaptative	22
1.3.3.2.	Interactions des cellules NK - cellules de l'immunité innée	22

2. Maladies auto-immunes	25
2.1. Généralités sur les maladies auto-immunes	25
2.1.1. Mécanismes aboutissant à la rupture de tolérance au soi	25
2.1.1.1. Mécanismes de tolérance centrale	26
2.1.1.2. Mécanismes de tolérance périphérique	26
2.1.2. Maladies auto-immunes systémiques ou spécifiques d'organe	29
2.2. Lupus Systémique	32
2.2.1. Epidémiologie	32
2.2.2. Données cliniques	32
2.2.3. Facteurs favorisants	35
2.2.4. Immunopathologie du Lupus Systémique	36
2.2.4.1. Données générales	36
2.2.4.2. Phénomènes initiateurs	39
2.2.4.3. Un mécanisme central : l'activation des pDCs via TLR9	42
2.2.4.4. Effets de l'IFN α et ses implications au cours du Lupus Systémique	44
2.2.3.5. Facteurs génétiques prédisposant au Lupus Systémique	47
2.3. Myopathies inflammatoires	49
2.3.1. Classification des différentes myopathies inflammatoires	49
2.3.2. Syndrome des Antisynthétases	52
2.3.2.1. Définitions	52
2.3.2.2. Mécanismes immunopathologiques	53
2.4. Traitement médical des maladies auto-immunes systémiques	54
3. Implication des cellules NK au cours des maladies auto-immunes	57
3.1. Modèles animaux	57
3.2. Pathologie humaine	58
3.2.1. Anomalies constatées	58
3.2.2. Causes possibles	60
3.2.3. Conséquences possibles	62
II. Objectifs	64

III. Résultats	66
1. Etude descriptive des cellules NK circulantes au cours du Lupus Systémique	67
1.1. Introduction	68
Article	68
1.2. Synthèse des résultats	78
1.3. Discussion complémentaire	78
2. Liens entre NKG2A et Auto-immunité	80
2.1. Introduction	80
Article	81
2.2. Interprétation des résultats	84
2.3. Discussion complémentaire	84
3. Modes spécifiques d'activation des cellules NK au cours du Lupus Systémique	85
3.1. Introduction	85
3.2. Patients et Méthodes	86
3.2.1. Patients	86
3.2.2. Préparations, tris et cultures cellulaires	86
3.2.3. Immunophénotypage lymphocytaire	88
3.2.4. Tests de polyfonction	88
3.2.5. Dosages d'IFN α sériques	88
3.2.6. Statistiques	89
3.3. Résultats	89
3.3.1. Etude de l'expression de TLR9 par les cellules NK au cours du Lupus Systémique	89
3.3.1.1. Niveau d'expression intracellulaire de TLR9 par les cellules NK	89
3.3.1.2. Phénotype des cellules NK exprimant TLR9	91
3.3.2. Effet <i>in vitro</i> de différents stimuli sur l'activation et les fonctions des cellules NK (cultures de PBMCs)	91
3.3.2.1. Effet du CpG ODN 2216, un ligand synthétique de TLR9	91

3.3.2.2. Evaluation de l'effet de l'IFN α -2a	92
3.3.2.3. Effet <i>in vitro</i> du CpG ODN 2216 sur les cellules NK triées	93
3.3.3. Effet <i>in vitro</i> de stimuli impliqués dans l'immunopathologie du Lupus Systémique sur l'activation des cellules NK	96
3.3.3.1. Effet des corps apoptotiques	96
3.3.3.2. Effet de l'ADN circulant	96
3.3.3.3. Effet des anticorps anti-ADN double brin (cultures de PBMCs ou cellules NK triées)	98
3.4. Discussion	98
3.4.1. Implication de la voie TLR9 au cours du Lupus Systémique	98
3.4.2. L'implication de la voie TLR9 ne semble pas dépendante de l'IFN α	99
3.4.3. Les auto-anticorps du Lupus Systémique semblent capables d'activer la voie TLR9 des cellules NK	101
3.4.4. La voie TLR9 des cellules NK pourrait être anormale au cours du Lupus Systémique	101
3.5. Conclusions	102
3.6. Références	102
 4. Etude descriptive des cellules NK au cours du Syndrome des Antisynthétases	 105
4.1. Introduction	105
<i>Manuscrit</i>	105
4.2. Interprétation des résultats	118
4.3. Discussion complémentaire	118
 IV. Discussion générale et Perspectives	 120
 1. Anomalies des cellules NK constatées au cours des maladies auto-immunes	 121
1.1. Anomalies des cellules NK au cours du Lupus Systémique	121
1.1.1. Hypothèses immunopathologiques	121

1.1.2.	Conséquences possibles des anomalies NK constatées	125
1.2	Anomalies des cellules NK au cours du Syndrome des Antisynthétases	126
1.2.1.	Hypothèses immunopathologiques	126
1.2.2.	Conséquences possibles	126
2.	Hypothèses concernant les différences phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK au cours du Lupus Systémique et du Syndrome des Antisynthétases	127
3.	Perspectives	129
3.1.	Intérêt de la poursuite de l'étude des cellules NK –isolément- au cours des maladies auto-immunes	130
3.1.1.	Développement de biomarqueurs	130
3.1.2.	Développement de nouvelles thérapies ciblées	131
3.2.	Etudes en parallèle de différents acteurs immunologiques impliqués dans l'immunopathologie des maladies auto-immunes.	132
3.2.1.	Vers une médecine personnalisée	132
3.2.2.	Vers une modélisation de la réponse immunitaire au cours des maladies autoimmunes systémiques	134
V.	Conclusion	136
VI.	Références	138
VII.	Annexes	149
Annexe 1 :	Critères ACR de classification du Lupus Systémique	150
Annexe 2 :	Critères de classification révisés : Systemic Lupus International Collaborating Clinics	151
Annexe 3 :	Score d'activité du Lupus Systémique (SLEDAI-2K)	152
Annexe 4 :	Syndrome des Antisynthétases : revue de la littérature	153

I. Introduction

1. Cellules Natural Killer

1.1. Définitions et Caractérisation

1.1.1. Données générales

Les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules immunitaires d'origine lymphoïde. Elles ont été identifiées il y a près d'une quarantaine d'années [1] et définies par leur capacité à lyser spontanément des cellules cibles (tumorales) sans immunisation préalable (cytotoxicité naturelle). Par la suite, l'ensemble de leurs fonctions a pu être précisé : les cellules NK sont capables d'exercer d'autres actions cytotoxiques qui répondent à plusieurs mécanismes d'activation, eux aussi non restreints à une spécificité antigénique, et de produire de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et facteurs de croissance cellulaire. Les cellules NK s'opposent ainsi aux lymphocytes T cytotoxiques, dont le mode de fonctionnement est spécifique d'un antigène donné et dont la présentation est couplé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. De ce fait, les cellules NK ont été considérées comme cellules appartenant à l'**immunité innée**.

Chez l'Homme, les cellules NK représentent $10 \pm 5\%$ des lymphocytes circulants. On peut les identifier en cytologie par leur grand cytoplasme granuleux (contenant des granules cytotoxiques). En cytométrie en flux, elles sont caractérisées par un phénotype **CD3⁻CD56⁺** [2]. CD56 (*Neural Cell-Adhesion Molecule-1*) est une molécule non spécifique aux cellules NK, impliquée dans les phénomènes d'adhésion et de migration. Ce phénotype CD3⁻CD56⁺ permet de les différencier d'autres lymphocytes non conventionnels, comme les NKT-like (CD3⁺CD56⁺), avec lesquelles elles partagent certaines fonctions. Les cellules NK sont aussi présentes dans de nombreux tissus (foie, endomètre, poumon ...) et dans les organes lymphoïdes secondaires [3,4].

1.1.2. Sous-populations de cellules NK

Deux sous-populations de cellules NK sont habituellement décrites (*Figure 1*): elles ont des fonctionnalités distinctes et sont différenciées par leur niveau

d'expression du CD56 et la présence du CD16, qui est le récepteur du fragment Fc des immunoglobulines (FcγR) de type IIIa :

- i) Les **lymphocytes NK CD56^{dim} CD16⁺** représentent $90 \pm 5\%$ des cellules NK circulantes mais seulement $10 \pm 5\%$ des cellules NK résidentes dans les tissus. Elles ont un rôle essentiellement cytotoxique, comme en témoignent les nombreux granules observés dans leur cytoplasme. Leurs capacités prolifératives et de production de cytokines sont faibles [5].
- ii) A l'inverse, les lymphocytes **NK CD56^{bright} CD16^{dim/-}** représentent seulement $10 \pm 5\%$ des cellules NK circulantes mais $90 \pm 5\%$ des cellules NK résidentes dans les tissus. Cette sous-population a un fort potentiel prolifératif et de grandes capacités de production de cytokines, mais une moindre cytotoxicité [5].

Ces deux sous-populations pourraient correspondre à des stades de maturation différents : en témoigne l'expression différentielle de certains autres récepteurs à leur surface, dont certains ont été reliés à la différenciation des cellules NK (*Figures 1 & 3*). Néanmoins, les mécanismes impliqués dans la transition de CD56^{bright} vers CD56^{dim} ne sont pas élucidés [6].

1.2. Modes d'activation des cellules NK

Pour être fonctionnelles, les cellules NK répondent à différents stimuli, dont l'intégration se fait via de nombreux récepteurs membranaires ou parfois intracellulaires [7]. Ceux-ci sont aussi bien des récepteurs activateurs ou inhibiteurs des fonctions des cellules NK. Chaque cellule NK possède un seuil d'activation qui est quantitativement la résultante d'une balance entre des signaux activateurs et des inhibiteurs (phénomène dit de « *balance d'activation* »). A l'état basal, on considère classiquement que la cellule NK possède « un tonus inhibiteur prédominant », l'empêchant de réagir contre le soi [7].

Il est également important de noter, que l'activation d'une cellule NK est aussi qualitative : selon la voie de signalisation qui est stimulée par la liaison du ligand à son récepteur, une cellule NK pourra réaliser plusieurs fonctions (polyfonctionnalité), ou être spécifique de l'une d'entre elles [8].

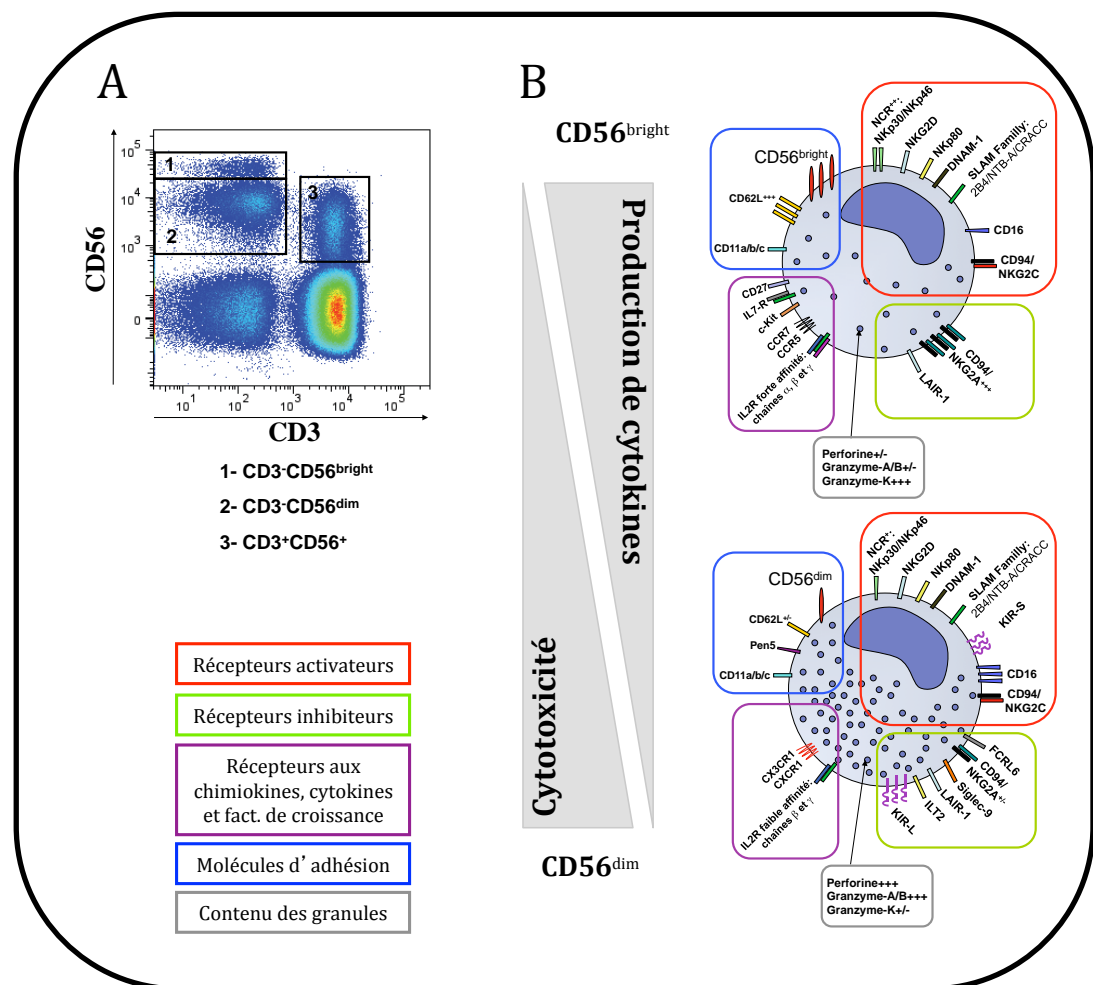


Figure 1 : Différences phénotypiques et fonctionnelles des sous-populations de cellules NK selon le niveau d'expression du CD56.

A. Distinction des sous populations de cellules NK en cytométrie en flux. **B.** Schématisation des différences phénotypiques et fonctionnelles des deux sous-populations de cellules NK CD56^{dim} et CD56^{bright}.

Courtoisie de Vivien Beziat, Karolinska Institutet, Stockholm, Suède.

De plus, l'activation des cellules NK dépend aussi du microenvironnement dans lequel elles évoluent [4], notamment du fait d'interactions qu'elles entretiennent avec d'autres cellules de l'immunité. Récemment, il a été suggéré que la durée d'exposition à cet environnement et la répétition dans le temps des stimuli que reçoit une cellule NK pourrait contrôler son niveau d'activation [9].

1.2.1. Les principaux récepteurs des cellules NK et leurs ligands

Parmi les nombreux récepteurs des cellules NK (*Table 1*), ceux qui ont été directement ou indirectement associés à l'auto-immunité seront plus spécifiquement décrits ici. On distingue notamment les récepteurs qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et à celle des lectines de type C (avec de nombreux représentants, activateurs ou inhibiteurs) [7]. De plus, les cellules NK expriment des récepteurs à diverses cytokines et chimiokines ainsi que des récepteurs à certains signaux de dangers [10].

1.2.1.1. La superfamille des immunoglobulines

Il s'agit d'une grande famille de récepteurs parmi lesquels on distingue notamment les Killer-cell immunoglobuline-like receptors (KIRs), les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines, en l'occurrence FcγRIIIa (ou CD16a), les récepteurs « leucocyte immunoglobulin-like » ou « immunoglobulin like transcripts » (LILRs/ILTs) et les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCRs).

1.2.1.1.1. Les KIRs

Les KIRs sont des glycoprotéines transmembranaires, regroupées sous le cluster de différenciation (CD)-158 [11]. Ces récepteurs sont exprimés surtout sur les cellules NK de type CD56^{dim}, mais peuvent également être exprimés par certains lymphocytes T CD8⁺. La nomenclature internationale regroupe et dénomme ces récepteurs selon le nombre de domaines d'immunoglobulines extracellulaires qu'ils possèdent (KIRxD) et la longueur de leur domaine intracytoplasmique, qui peut être long (L) ou court (S). Ainsi, les KIR-L comprennent un domaine intracellulaire contenant des motifs ITIM

Table 1 : Principaux récepteurs membranaires des cellules NK et leurs ligands.*D'après Montaldo E & coll. Cytometry A, 2013.*

Récepteurs	Sous-Famille	Dénomination CD	Noms alternatifs	Expression	Expression	Ligands connus
				CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}	
Inhibiteurs	LILRs/ ILTs	CD85j	ILT2/ LIR1	-	+	HLA-I (large spécificité), UL-18 (CMV)
	KIRs	CD158a	KIR2DL1	-	+	HLA-C groupe w2
	KIRs	CD158 b1/b2	KIR2DL2/2DL3	-	+	HLA-C groupe w1
	KIRs	CD158d	KIR2DL4 ?	+	+	HLA-G
	KIRs	CD158e1	KIR3DL1	-	+	HLA-B groupe w4
	KIRs	CD158f	KIR2DL5	-	+	?
	KIRs	CD158k	KIR3DL2	-	+	HLA-A*0, & *11, CpG ODN
	C-lectines	CD159a/CD94	NKG2A/KLRD-1	+++	++	HLA-E
	C-lectines	CD161	NKR-P1	+++	++	LLT1
		CD300a	IRp60	+	+++	?
		CD305	LAIR-1	+++	+++	Collagène
	Ig-like lectine	CD328	Siglec-7/p75/ AIRM1	+++	+++	Acide sialique
	Ig-like lectine	CD329	Siglec-9	-	+	Acide sialique
			Tim-3	-	+	Galectin-9 ?
Activateurs		CD7		+++	+++	SECTM1, Galectine
	Fc-R	CD16a	FcγRIIIa	+	+++	IgG (faible affinité)
	KIRs	CD158e2-f	KIR3DS1-5	-	+	HLA-Bw4 (?) - ?
	KIRs	CD158h	KIR2DS1	-	+	HLA-C2 (faible affinité)
	KIRs	CD158i-j-g	KIR2DS4-2/3-5	-	+	HLA-A*11, HLA-C (certains) - ? - ?
	KIRs	CD158d	KIR2DL4	+	+++	HLA-G
	C-lectines	CD159c/CD94	NKG2C/KLRD-1	+	+	HLA-E
		CD160	BY55	-	+	CMH-Ia/b, HVEM
		CD226	DNAM-1	+++	+++	CD155 (PVR), CD112 (Nectin-2)
	SLAM	CD244	2B4	+++	+++	CD48
	C-lectines	CD314	NKG2D	+++	+++	ULBPs, MICA-B
	SLAM	CD319	CRACC	+++	+++	CRACC
	NCRs	CD335	Nkp46	+++	+++	Héماغlutinine (Grippe) ?
	NCRs	CD336	Nkp44	-	-	Nkp44-L, MLL5-like P, PCNA, E-protein (Dengue),
	NCRs	CD337	Nkp30	++	++	B7H6, BAT3, pp65 (CMV)
	SLAM	CD352	NTB-A	+++	+++	NTB-A
	C-lectines		Nkp80/KLRF1	+++	+++	AICL (Activation induced C-type lectin)
Molécules d'adhésion		CD2	LFA-2	+++	+	CD58, CD48
		CD11a/CD18	LFA-1	-	++	ICAM-1-3
		CD11b/CD18	αMβ2	+	+++	Fibrinogène, ICAM-4, C3bi
		CD11c/CD18	αXβ2	+	+++	Fibrinogène, ICAM-1, C3bi
		CD44	gp90	+++	+++	Acide Hyaluronique
		CD56	N-CAM	+++	++	?, FGFR1 ?
		CD57	Human NK-1	-	++	?
		CD58	LFA-3			CD2
		CD59	MIRL			Complement 8,9
		CD62-L	L-Selectine	+++	+	Gly/Mad CAM-1
		CD162	PSGL-1/ PEN-5	++	++	P-sélectine
			KLRG1	-	+	E/N/P-Cadhérines
Aux Cytokines et Chimiokines		CD25	IL2-Rα (haute affinité)	+	-	IL2
		CD117	c-Kit	+++	++	IL2, IL15
		/CD118	IFNAR-1/2	+	+	IFN-I
		CD122/CD132	IL2-Rβ/γ (faible affinité)	++	+	SCF
		CD127	IL7-Rα	++	-	IL7
		CD128	CXCR1	-	++	IL8
		CD183	CXCR3	++	++	CXCL9-10-11
		CD184	CXCR4	++	++	CXCL2
		CD194	CCR4	-	+	CCL2, MIP-1β (CCL4), RANTES, CCL17-22
		CD197	CCR7	++	-	CCL19-21
		CD212	IL12-Rβ1/2	+	+	IL12
		CD215	IL15-Rα	+	+	IL15
		CD218a	IL18-R	+	++	IL18
		CD360	IL21-Rα/ NLR	+	+	IL21
			ChemR23	+	++	Chemerin
			CX3CR1	+	+++	Fractalkine

(*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*), qui confèrent une activité inhibitrice [12]. A contrario, les KIR-S ne possèdent pas de motifs ITIM mais ont la capacité de se lier à un adaptateur (DAP12), qui est porteur d'un motif ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) [13]. C'est ce dernier qui permet aux récepteurs KIR-S d'être récepteurs activateurs.

i) Les KIRs inhibiteurs (KIR-L)

Sept gènes KIRs inhibiteurs ont été identifiés à ce jour et codent pour KIR2DL1, 2, 3, 5 et KIR3DL1-3 [14]. Ces récepteurs ont des affinités différentes pour leurs différents ligands spécifiques, qui sont certaines molécules du CMH-I (ou HLA-I : *Human Leucocyte Antigen*). Ils sont explicitement présentés dans la *Table 1*. Dans les années 1990, la description de la lyse naturelle de cellules tumorales n'exprimant pas de molécules CMH-I par les cellules NK ainsi que la découverte des KIR-L et leurs ligands, ont permis d'élaborer une théorie (qui a depuis évoluée) : la théorie du « soi-manquant » ou « **missing-self recognition** », selon laquelle les cellules NK s'activent en l'absence de liaison KIR-L/HLA-I avec leur cible [15].

ii) Les KIRs activateurs (KIR-S)

Les KIR-S identifiés sont au nombre de 6 actuellement : KIR2DS1-5 et 3DS1. Comme leur équivalent KIR-L, ils reconnaissent certaines molécules HLA-I, mais tous les ligands des KIRs n'ont pas tous été identifiés [16]. Il est important de noter que l'affinité des KIR-L pour leurs ligands, dont HLA-C [17] est supérieure à celles des KIR-S. De plus, d'importantes recherches portent sur l'identification de ligands de ces KIRs qui n'appartiendraient pas tous à la famille du CMH-I.

iii) KIR2DL4

Au sein des KIR-L, KIR2DL4 fait figure d'exception. En effet, il s'agit d'un récepteur activateur qui reconnaît HLA-G [18], une molécule du CMH-I non classique, qui est exprimée sur les cellules trophoblastiques normales et participe ainsi au contrôle de la reconnaissance materno-fœtale [19].

Du point de vue génétique, les KIRs sont codés par 15 gènes et 2 pseudo-gènes, situés en 19q13.4 [14]. Ils sont répartis dans deux haplotypes, A et B (*Figure 2*). L'haplotype A est invariant et contient essentiellement des gènes KIRs inhibiteurs et un seul KIR activateur: KIR2DS4, tandis que l'haplotype B est variable et contient de nombreux gènes KIRs activateurs. La répartition de ces haplotypes chez un individu

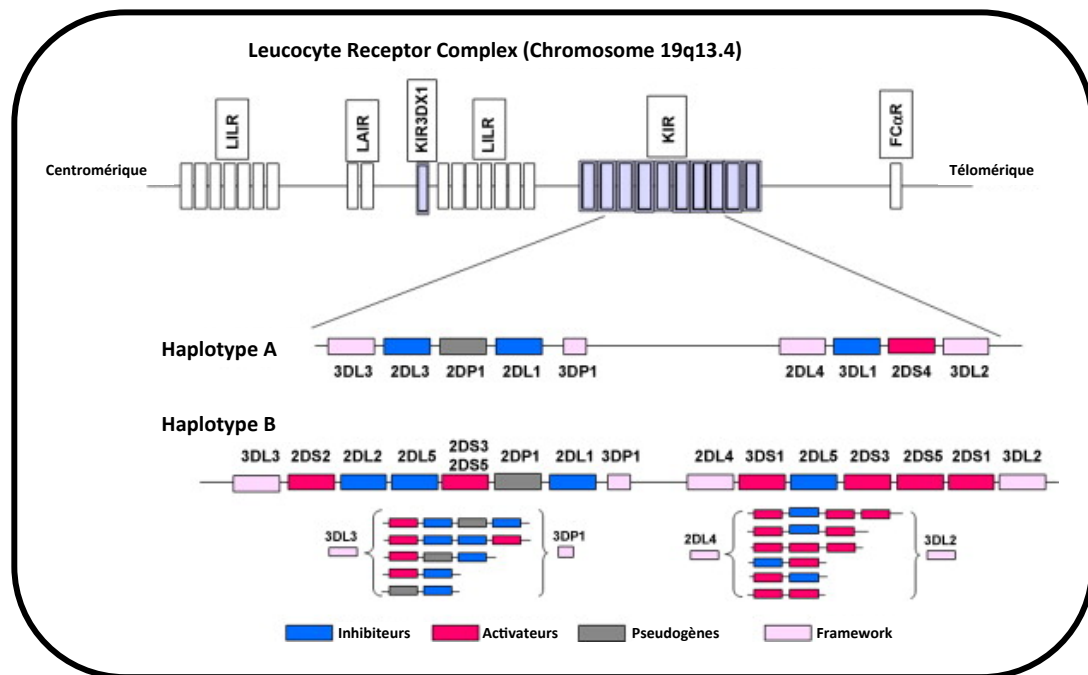


Figure 2 : Organisation des gènes KIRs.

Les gènes KIRs sont localisés sur le chromosome 19q13.4. On distingue deux haplotypes. L'haplotype A qui est invariant et comporte un seul KIR activateur et l'haplotype B est caractérisé par un nombre variable de gènes, dont de nombreux KIRs activateurs.

D'après Kulkarni S et coll. Semin immunol, 2008.

pourrait conférer aux cellules NK un seuil d'activation différent, qui pourrait être lié à la survenue de certaines pathologies infectieuses, inflammatoires ou auto-immunes, comme le Lupus Systémique [20,21].

1.2.1.1.2. FcγRIIIa (CD16a)

Ce récepteur de faible affinité n'est pas spécifique des cellules NK, mais se retrouve également à la surface des cellules de la lignée monocyte/macrophage. Il reconnaît préférentiellement les sous-classes d'IgG1 et 3. Il est essentiellement exprimé par les cellules NK de phénotype CD56^{dim}. Pour transmettre un message activateur, le CD16a est capable de s'associer à des motifs ITAMs portés par la chaîne CD3ζ par exemple [22]. Il est impliqué dans des phénomènes cytotoxiques médiés par les anticorps, appelés **ADCC** (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) [23]. Les FcRs permettent aussi la clairance des complexes immuns circulants (complexes antigène-anticorps) notamment par leur internalisation dans le cytoplasme : ces mécanismes semblent importants au cours de certaines maladies auto-immunes [24].

1.2.1.1.3. Les LILR/ILT

Les récepteurs LILR (ou ILT) ont été regroupés sous l'identification CD85. On dénombre 13 gènes situés à proximité de ceux des KIRs, avec qui ils partagent des homologies structurales (domaines immunoglobuline-like extracellulaires, domaines ITIM intracytoplasmiques) [25]. ILT2 (CD85j, LIR1 ou LILRB1) est le seul membre de cette famille à être exprimé par les cellules NK CD56^{dim}, mais également par certains lymphocytes T CD8⁺. ILT2 se lie avec une faible affinité à presque toutes les molécules du CMH-I classiques (A, B, C) ou non classiques (E, F, G). Il peut aussi lier des protéines virales ayant des homologies avec ces dernières, comme UL-18 produite par le Cytomégalo-Virus (CMV) [26].

1.2.1.1.4. Les NCRs

A ce jour, cette famille comporte trois membres: **NKp46, NKp44 et NKp30** (NCR1-2 et -3, respectivement) [27]. Bien que décrits pour certains dans quelques très

rares sous-populations lymphocytaires T, ces récepteurs sont hautement spécifiques des cellules NK [27].

Tandis que **NKp30** et **NKp46** sont exprimés de façon constitutive, **NKp44** n'est détecté à la surface des cellules NK qu'après leur activation. Leur niveau d'expression (ou densité) semble important dans la régulation des fonctions des cellules NK qu'ils engendrent après liaison avec leurs ligands. De plus, trois isoformes de **NKp30** ont été décrits. Ils résultent d'un épissage alternatif du gène, en rapport avec l'existence de polymorphismes mono-nucléotides et sont associés à des fonctions effectrices des cellules NK différentes [28].

Les ligands des NCRs ne sont à ce jour que partiellement identifiés : il peut s'agir de ligands issus de pathogènes d'origine :

- (i) **virale** : comme l'hémagglutinine du virus influenza pour NKp46, la protéine E du virus de la Dengue pour NKp44 ou la protéine pp65 du CMV pour NKp30,
- (ii) **bactérienne** : comme certains composants non identifiés de *Mycobacterium tuberculosis* pour NKp44 ou encore
- (iii) **parasitaire** : comme la protéine PfEMP-1 du *Plasmodium falciparum*, qui pourrait se lier à NKp30.

Néanmoins, l'implication de ces récepteurs dans la lyse de cellules tumorales, suggère également l'existence de ligands endogènes, comme cela a été montré pour NKp44 qui reconnaît une isoforme de la protéine MLL5 (*mixed-lineage leukemia 5*) [29] ou pour NKp30 qui reconnaît B7-H6 et BAT3 (protéines d'origine tumorale) [30]. Ces récepteurs sont activateurs, grâce leur capacité à se lier à différents adaptateurs présents dans les cellules NK et porteurs de motifs ITAMs, comme DAP10 ou DAP12. Ce mode d'activation, proche de celui de NKG2D dont il sera question par la suite, correspond à un mécanisme de type « **stress-induced recognition** ».

1.2.1.1.5. DNAM-1 (CD226)

Il s'agit d'une glycoprotéine non spécifique des cellules NK, qui est également exprimée par certains lymphocytes T et les monocytes/macrophages [31]. DNAM-1 (*DNAX Accessory Molecule-1*) active la cytotoxicité des cellules NK et la production de cytokines [32], grâce notamment aux résidus Tyrosine de son domaine intracellulaire. DNAM-1 est impliqué (en association avec d'autres récepteurs) dans la reconnaissance de nombreuses cellules tumorales [33] et également dans les interactions avec les

cellules dendritiques myéloïdes (mDCs) et les lymphocytes T [34]. En effet, dans certaines conditions ces cellules expriment les ligands endogènes de DNAM-1 : CD112 (Nectin-2) et CD155 (récepteur du *Poliovirus*), qui appartiennent à la famille des nectines.

1.2.1.2. La superfamille des Lectines de type C

Cette famille de récepteurs transmembranaires, définis par leur structure extracellulaire de type lectine de type C, comprend de nombreux membres dont NKG2A, C, E et F ainsi que deux variants (NKG2B et H) et également NKG2D, CD94 et CD161. Certains de ces récepteurs sont activateurs et d'autres inhibiteurs.

1.2.1.2.1. Les récepteurs inhibiteurs

On distingue dans ce sous-groupe :

- i) le récepteur **CD94/NKG2A** qui est très conservé d'après les données phylogénétiques actuellement disponibles. CD94/NKG2A (et son variant NKG2B) est un récepteur inhibiteur qui possède un domaine intracellulaire de type ITIM. Il existe sous la forme d'un hétérodimère en interaction avec CD94 [35] : c'est ce dernier qui permet à NKG2A d'être présent à la surface des cellules NK et d'être pleinement fonctionnel. CD94/NKG2A est exprimé par les cellules NK de phénotype CD56^{bright} et une partie des CD56^{dim}. Certaines sous-populations lymphocytaires T CD8⁺ peuvent aussi exprimer CD94/NKG2A à leur surface. L'hétérodimère CD94/NKG2A reconnaît une molécule du CMH-I non conventionnelle et peu polymorphe : HLA-E [36]. HLA-E présente des peptides dérivés des molécules HLA-I conventionnelles et de HLA-G [37,38]. L'expression de HLA-E à la surface des cellules cibles est donc dépendante des autres molécules du CMH-I.
- ii) le **CD161** est également un récepteur non spécifique des cellules NK (il est aussi retrouvé sur lymphocytes T et les NKT). Il est exprimé précocement sur les cellules NK au cours de leur différenciation sous forme d'homodimère [39]. Sa physiologie est complexe. Sur les cellules NK, il a d'abord été considéré comme récepteur inhibiteur [40,41]. Toutefois certains travaux suggèrent qu'il puisse avoir également un rôle activateur [42]. Son ligand endogène LLT1 (*lectin-like*

transcript-1 ou CLEC2D) [43] est exprimé par les lymphocytes B et les différentes populations de cellules dendritiques après activation par les Toll-like récepteurs (TLRs) [44,45]. CD161 est notamment impliqué dans les défenses antivirales et anti-tumorales.

1.2.1.2.2. Les récepteurs activateurs

Parmi les nombreux récepteurs que ce sous-groupe comporte (NKG2C-F et H), CD94/NKG2C et NKG2D sont les mieux décrits.

- i) **CD94/NKG2C** est la contrepartie activatrice de CD94/NKG2A. Il existe également sous forme hétérodimérique, associé à CD94 et lie aussi HLA-E [36]. CD94/NKG2C exerce une action activatrice via la molécule adaptatrice DAP12. Ce récepteur n'est pas ou très faiblement exprimé sur les cellules NK de sujets sains [46]. Différents travaux ont montré que son expression pouvait très nettement augmenter au cours d'infections virales, telles que les hépatites B et C ou l'infection à CMV [47,48]. Même après résolution de la primo-infection à CMV (la séro-prévalence est différente selon les zones géographiques, et peut atteindre 60% des adultes en Europe), les cellules NK peuvent garder un phénotype particulier CD94/NKG2C⁺; dans ce cas, l'expression de CD94/NKG2C est mutuellement exclusive de celle de CD94/NKG2A.
- ii) **NKG2D** est un récepteur assez distinct des autres récepteurs de la famille des NKG2. Il est exprimé sous forme d'homodimère sur toutes les cellules NK. Toutefois, son niveau d'expression (ou densité) est variable. Il n'est pas spécifique des cellules NK, étant également retrouvé à la surface de certains lymphocytes T. NKG2D est un récepteur activateur, grâce à son interaction avec une molécule adaptatrice, DAP-10, qui est en mesure d'activer la Pi3-Kinase. Il reconnaît une large famille de molécules de stress, présentant des analogies structurales avec des molécules du CMH-I : il s'agit de MIC-A, B et des ULBP-1-6 [49]. Ces molécules, qui peuvent également exister sous des formes solubles, ne sont pas exprimées par des cellules normales, mais exclusivement par des cellules ayant subi un « stress ». NKG2D est ainsi en mesure de reconnaître des modifications cellulaires induites par certains processus pathologiques (infection, carcinogénèse [50], chocs oxydatif ou thermique et également des pathologies auto-immunes [51]). Il est capable d'engendrer l'activation des cellules NK : on

parle alors de reconnaissance induite par le stress, ou « ***stress-induced recognition*** ».

1.2.1.3. Les récepteurs de cytokines, facteurs de croissance et chimiokines

Les cellules NK expriment également de nombreux **récepteurs aux cytokines** [7], **aux chimiokines** [52] **et aux facteurs de croissance**. Ces molécules, solubles ou membranaires, interviennent dans la différenciation et la prolifération des cellules NK mais aussi directement dans l'activation de leurs différentes fonctions.

On peut citer par exemple l'**IL2-Récepteur** (l'IL2 est produite par les lymphocytes T), dont certaines sous-unités sont partagées avec l'**IL15-Récepteur** (l'IL15 est produite par certaines cellules dendritiques). Ces deux voies engendrent la prolifération des cellules NK et augmentent leur cytotoxicité [53]. De même, il existe à la surface des cellules NK des récepteurs à l'IL7 et à l'IL4 ou encore à l'IL21, impliquées également dans l'activation de la cytotoxicité des cellules NK.

D'autres récepteurs comme l'**IL12-Récepteur** et l'**IL18-Récepteur** sont importants dans la fonctionnalité des cellules NK, car ils activent la production de différentes cytokines. En effet, en combinaison avec l'IL18 (produite par les macrophages), l'IL12 (surtout produite par les mDCs et les monocytes) est un puissant inducteur d'IFN γ [8]. Par contre, en association avec l'IL15, l'IL12 favorise la production d'IL10, TNF α ou MIP-1 α ou - β .

Il faut aussi mentionner l'**IFN α -Récepteur** [7], car l'**IFN α** -produite majoritairement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs)- joue un rôle majeur dans de nombreuses situations pathologiques, comme les infections virales [54] ou certaines maladies auto-immunes [55]. La liaison de l'IFN α à son récepteur dimérisé induit l'activation de la cytotoxicité des cellules NK.

Afin d'être actives sur le site inflammatoire ou au sein des organes lymphoïdes, les cellules NK doivent non seulement migrer à travers les vaisseaux sanguins et les tissus mais également établir des contacts avec les cellules cibles. Ceci est possible grâce aux sélectines (comme **CD62-L**) ou aux intégrines qu'elles expriment [7] et aux récepteurs de chimiokines (parmi lesquels **CCR7**, **CX3CR1** etc...).

1.2.1.4. Les récepteurs aux signaux de dangers : les TLRs intracellulaires

Les TLRs appartiennent à une large famille de récepteurs, les PRRs (*Pattern Recognition Receptor*), qui reconnaissent différents motifs présents sur l'ensemble des agents pathogènes, regroupés sous le nom de PAMPs (*pathogen-associated recognition receptors*) ou « signaux de dangers » [56]. Ils sont très conservés au sein des espèces et sont exprimés par l'ensemble des cellules appartenant à l'immunité innée. Ils assurent, comme rôle primordial, l'initiation de la réponse immunitaire innée.

Parmi les différents TLRs identifiés, certains sont extracellulaires et reconnaissent des ligands présentés à la surface des agents pathogènes. C'est le cas par exemple de TLR2, 4 ou 5 qui reconnaissent des motifs bactériens (Lipoprotéines ou Peptidoglycane, Lipopolysaccharide ou Flagelline, respectivement) [57]. D'autres TLRs sont intracellulaires [58] (présents dans l'appareil de Golgi à l'état basal ou dans des vésicules d'endocytose dans certaines conditions) [59]. Ces derniers, comme TLR3, TLR7 ou TLR9, reconnaissent des motifs intracellulaires, notamment des acides nucléiques bactériens, viraux ou endogènes, qui existent sous différentes formes :

- ARN double brin pour **TLR3**,
- ARN simple brin pour **TLR7**
- ADN riche en motif CpG non méthylés pour **TLR9**.

Ces trois TLRs sont exprimés par différentes cellules immunitaires, dont les cellules NK [60], et interviennent dans l'activation cellulaire par des voies de signalisation faisant intervenir notamment NFkB, via TRIF (*Toll/IL-1 receptor-domain containing adapter-inducing interferon-β*) pour TLR3 et via MyD88 pour TLR7 et TLR9 [61]. Parmi ces trois TLRs, les effets de la liaison de TLR9 avec ses ligands « synthétiques » CpG ODN A, B ou C, a été la plus étudiée. Celle-ci induit, dans certaines conditions de culture *in vitro* et souvent en synergie avec d'autres signaux solubles ou cellulaires, la stimulation des cellules NK, et notamment la production d'IFNγ [10]. Toutefois son implication spécifique dans des situations pathologiques reste peu étudiée.

1.2.1.5. Autres co-récepteurs et marqueurs d'activation

Il existe à la surface des cellules NK d'autres co-récepteurs, comme **2B4** (CD244), et **NKp80** (qui ne seront pas détaillés ici) [7]. De même, d'autres marqueurs

témoignant de l'activation des cellules NK peuvent être cités, comme **CD69** ou **HLA-DR**. Aucun de ces récepteurs n'est spécifique des cellules NK.

Enfin, d'autres marqueurs peuvent être mentionnés, comme **CD8 α** et **CD57**. Ils ne sont pas spécifiques des cellules NK mais paraissent associés à leur état de maturation. Le CD57 est un carbohydrate qui est uniquement présent sur les cellules NK CD56^{dim}. En référence aux données qui concernent son expression sur les lymphocytes T, il pourrait être un marqueur de sénescence cellulaire [62]. Toutefois, certains travaux spécifiques aux cellules NK suggèrent que l'expression du CD57 est aussi liée à de plus grandes capacités cytotoxiques (cytotoxicité naturelle ou ADCC) et donc à leur implication au cours d'infections virales [63], à des pathologies tumorales et auto-immunes [64].

1.2.2. Acquisition des différents récepteurs au cours de la différenciation et la maturation des cellules NK

Les études portant sur la différenciation et la maturation des cellules NK sont de réalisation et donc d'interprétation difficile chez l'Homme. Le processus de différenciation des cellules NK est un phénomène continu, qui permet l'acquisition séquentielle des différentes fonctions des cellules NK et correspond à l'expression des marqueurs de surface caractéristiques. Dans les différents modèles *in vitro* proposés mais également au cours des greffes de cellules souches hématopoïétiques [65], l'expression des différents récepteurs irait dans le sens d'une diminution du seuil d'activation et d'une augmentation des capacités cytotoxiques des cellules NK (*Figure 3*) [66].

1.3. Fonctions des cellules NK

Parmi les fonctions des cellules NK (qui comportent cytotoxicité, production de cytokines et de chimiokines) on établit classiquement une dichotomie entre leurs actions effectrices et immunomodulatrices. Chacune d'entre elles peut être la résultante des actions cytotoxiques ou de production de cytokines, selon que ces actions s'exercent sur d'autres cellules de l'immunité ou directement au niveau des tissus ou cellules cibles.

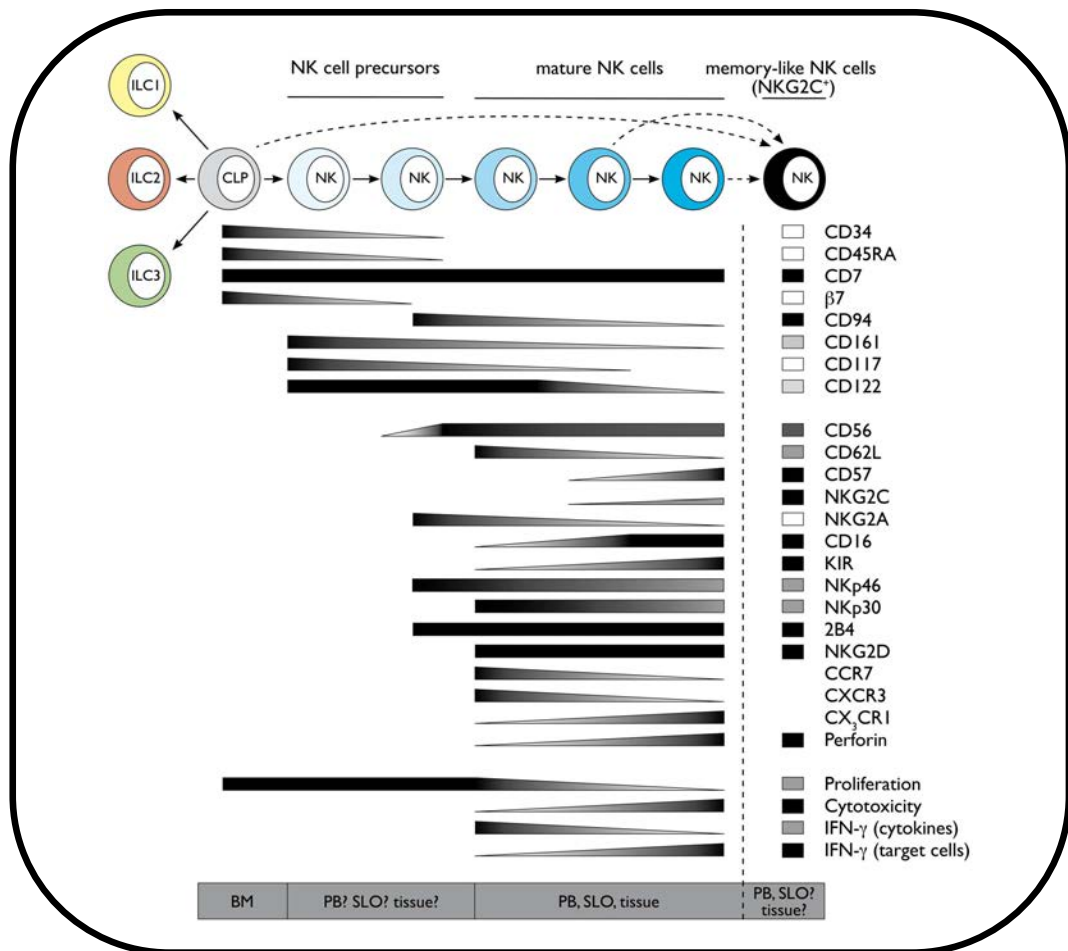


Figure 3 : Expression des différents récepteurs de surface et principales fonctions des cellules NK selon le stade de différenciation et de maturation.

L'acquisition ou la perte des marqueurs de surface et des fonctions des cellules NK sont représentées en nuances de gris : noir (fort niveau d'expression) et blanc (absence d'expression). CLP : progéniteur lymphoïde commun ; BM : moëlle osseuse ; PB : compartiment sanguin ; SLO : organes lymphoïdes secondaires.

D'après Luetke-Eversloh & coll. *Frontiers in Immunology*, 2013.

1.3.1. Cytotoxicité

Il existe non seulement plusieurs modes de déclenchement de la cytotoxicité mais également plusieurs voies effectrices.

1.3.1.1. Modes de déclenchement de la cytotoxicité

L'induction de la cytotoxicité d'une cellule NK peut se faire selon trois modes d'interaction avec une cible (*Figure 4*) :

- i) **Reconnaissance via un anticorps : ADCC.** Les cellules NK qui expriment le CD16a (donc majoritairement des cellules NK CD56^{dim}) sont capables de reconnaître une cible recouverte d'anticorps spécifiques, via ce récepteur de faible affinité [23]. Ce mécanisme n'est pas spécifique aux cellules NK, étant donné que d'autres cellules de l'immunité innée expriment ce type de récepteurs. Le rôle biologique de l'ADCC a été mis en évidence dans des situations telles que le rejet de greffe, l'immunité anti-tumorale et dans certaines situations infectieuses ou auto-immunes. C'est ce par ce mécanisme qu'une biothérapie : l'anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab®), s'avère efficace dans les pathologies impliquant le lymphocyte B, comme les lymphoproliférations B malignes ou les maladies auto-immunes [67].
- ii) **Reconnaissance de l'absence du soi.** Comme cela a été indiqué précédemment, les cellules NK sont capables de lyser sans sensibilisation préalable des cellules cibles. Le mécanisme de cette lyse « naturelle » est à mettre en rapport avec la sous-expression par des cellules cibles des molécules du CMH-I. Ceci a pour effet de lever l'inhibition prédominante exercée par la liaison HLA-I/KIR-L qui pèse sur la cellule NK. Néanmoins, depuis la description initiale de la théorie du « *Missing-Self Recognition* » [15], il est apparu que la physiologie des cellules NK est plus complexe et ne dépend pas seulement des interactions des KIRs avec leurs ligands. En effet, elle est également liée à des interactions entre les nombreux autres récepteurs activateurs ou inhibiteurs avec leurs ligands respectifs. Il est important de noter que la reconnaissance de l'absence du soi implique que les cellules NK aient été éduquées à la reconnaissance du soi. Ce mécanisme complexe et controversé pourrait théoriquement être à l'origine d'une rupture de tolérance au soi.

- iii) **Reconnaissance de ligands de stress.** Par le biais de récepteurs activateurs, comme les NCRs, NKG2D ou encore DNAM-1, une cellule NK est en mesure de s'activer et de lyser une cible qui exprime des molécules de stress [27]. Ces différentes molécules de stress sont générées dans différentes situations par des cellules tumorales ou infectées, ou encore des cellules présentant des anomalies de réplication de l'ADN ou lésées par des radiations comme les rayons ultraviolets.

1.3.1.2. Mécanismes effecteurs

Une fois activée de la sorte, une cellule NK peut entraîner la lyse d'une cible selon plusieurs voies :

- i) **L'exocytose de granules cytotoxiques** contenant des enzymes protéolytiques (telles que perforine et granzyme) engendre la destruction des membranes cellulaires [68]. Ce mécanisme est commun avec les cellules T CD8⁺ cytotoxiques. A la différence de ces dernières, les cellules NK sont capables de former les granules cytotoxiques tôt dans leur développement et de les conserver dans leur cytoplasme pour répondre rapidement face à une cellule cible, quelque soit sa nature.
- ii) **L'engagement de récepteurs de mort cellulaire.** Les cellules NK expriment des ligands qui sont capables de se lier à des récepteurs dits de « mort cellulaire », présents à la surface des cellules cibles. L'engagement de ces récepteurs induit l'apoptose par activation des voies dépendantes des caspases [69]. Ces ligands appartiennent à la superfamille du TNF α . On peut citer par exemple le système FAS/FAS-Ligand [70] qui est la voie majoritairement utilisée par les cellules NK. D'autres voies sont utilisées comme : TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*)/TRAIL-Recepteur qui est induit par exemple après activation par l'IL15, ou encore les voies d'apoptose médiées par le TNF α lui même, dans sa forme soluble ou membranaire [71].

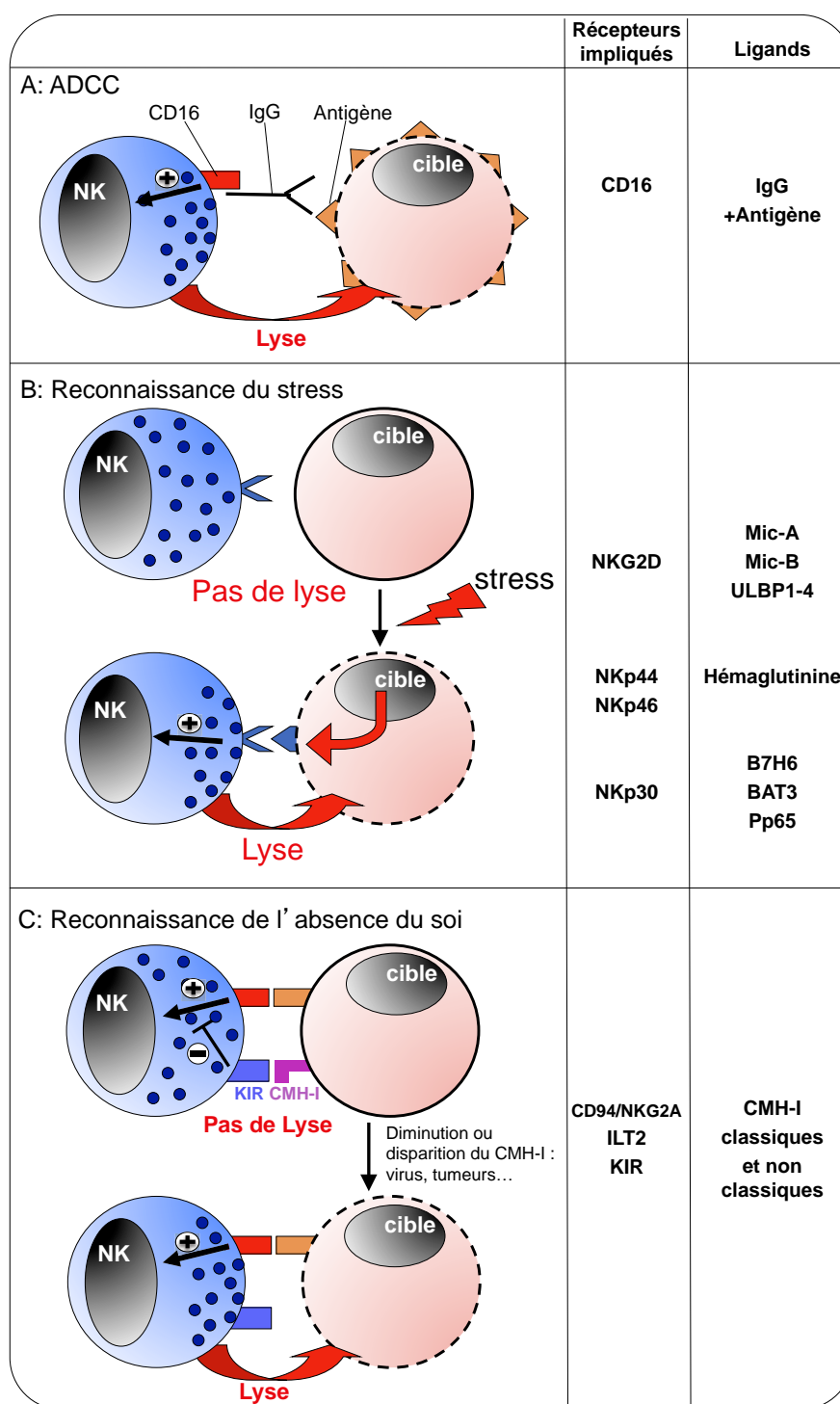


Figure 4 : Mécanismes d'activation de la cytotoxicité des cellules NK.

L'activité lytique des cellules NK peut être déclenchée par différents modes de reconnaissance des cibles. **A.** Anticorps (ADCC : *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*). **B.** Molécule de stress et **C.** Absence de molécules du soi (CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité).

D'après Vivien Beziat, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

1.3.2. Production de chimiokines, cytokines et facteurs de croissance

1.3.2.1. Chimiokines

La fonction principale des chimiokines est d'attirer d'autres populations cellulaires sur le site de l'inflammation. Parmi les quatre sous-familles de chimiokines décrites : CC, CXC, C et CX3C, les cellules NK produisent notamment les CC suivantes : CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α) ou CCL4 (MIP-1 β) [52]...

1.3.2.2. Cytokines

En réponse à différents stimuli, les cellules NK, notamment celles qui sont de phénotype CD56^{bright}, sont capables de produire rapidement et en grande quantité diverses cytokines [7]. Outre de l'IFN γ , elles synthétisent du TNF α , du TGF β ou encore du GM-CSF et d'autres interleukines : IL3, 5, 8 et 3. Les types et les quantités de cytokines produites dépendent des conditions de stimulation : schématiquement l'IL1 β , l'IL21, l'IL2 favorisent la production des diverses cytokines, tandis que l'IL4 ou le TGF β exercent un impact négatif sur celle-ci. Les combinaisons de cytokines déterminent également quelles cytokines vont être produites : par exemple, l'IL15 et l'IL18 induisent la sécrétion de GM-CSF et d'IL13.

L'IFN γ est considérée comme la cytokine clef produite par les cellules NK. Sa synthèse est optimale en présence d'IL12 et d'IL18 (*Figure 5*) et fait intervenir des voies de signalisation qui passent par MyD88 [8]. La production d'IFN γ par d'autres voies mettant en jeu des récepteurs activateurs comme NKp30 ou NKG2D est possible : cela requiert des interactions directes cellules-cellules. L'IFN γ agit sur de très nombreux composants du système immunitaire et passe par des voies d'activation telles que STAT1, IRF1 et IRF9 et la régulation de nombreux gènes [72]. On peut ainsi citer :

- l'activation, la maturation et la régulation positive de la présentation antigénique par les cellules présentatrices d'antigènes (augmentation de l'expression des molécules du CMH-I et II)
- le contrôle du switch des immunoglobulines par les lymphocytes B
- l'orientation de la réponse lymphocytaire T de type TH1
- l'activation des macrophages

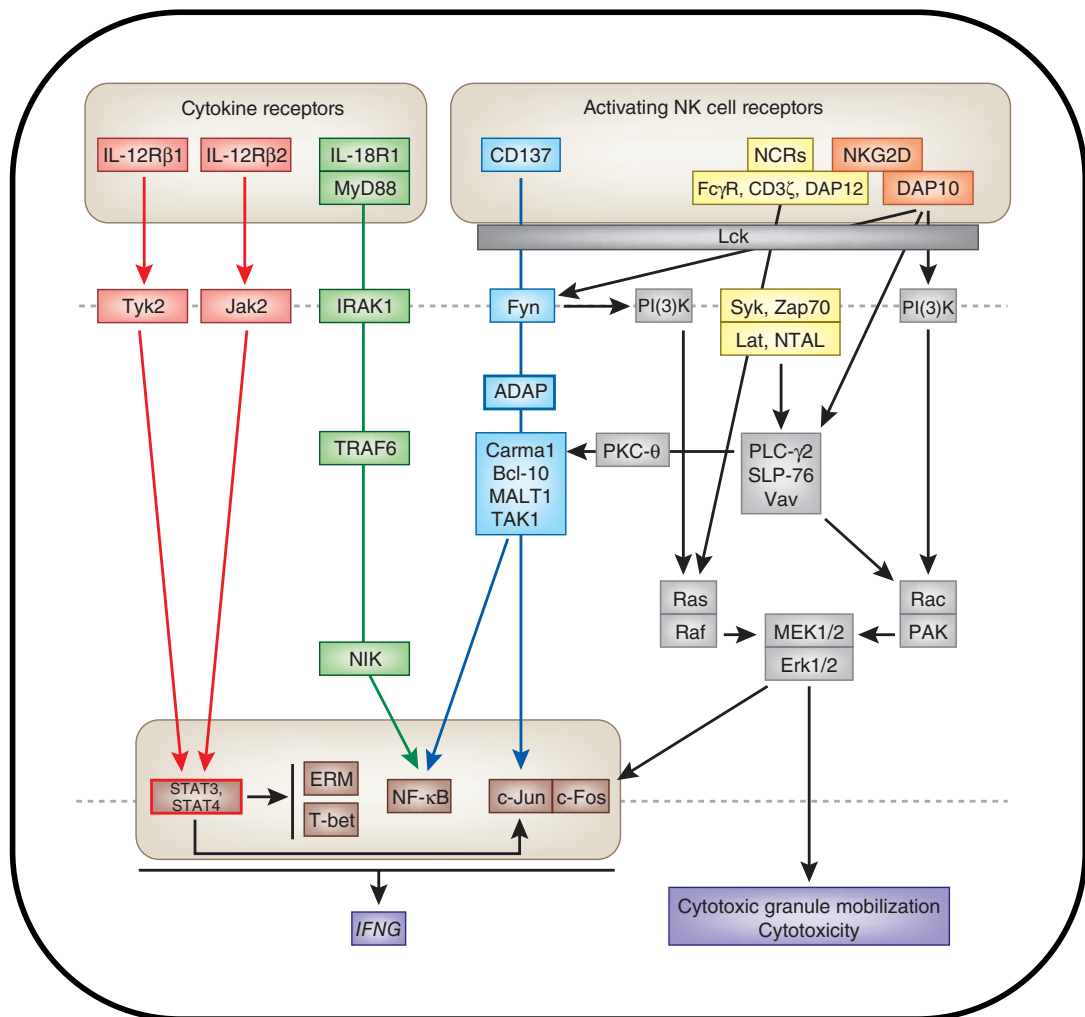


Figure 5 : Voies de production d'IFN γ par les cellules NK et voies d'activation de la cytotoxicité .

Deux voies d'activation de la production sont représentées : via les récepteurs aux cytokines impliquées (IL12 et IL18) et via les récepteurs activateurs : NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors) & NKG2D.

D'après Vivier E & coll. Nature Rev Immunol, 2013.

- des effets pro-apoptotiques et antiprolifératifs.

Ainsi, l'IFN γ est également une cytokine qui joue un rôle important dans de nombreuses situations pathologiques, notamment au cours des maladies auto-immunes, comme le Lupus Systémique ou le Syndrome de Gougerot-Sjögren [73,74]. De plus, d'autres cytokines produites par les cellules NK impactent directement la fonction de cellules immunitaires, comme le GM-CSF qui favorise la maturation des cellules dendritiques, de la lignée monocyte/macrophage ou encore la prolifération des polynucléaires neutrophiles. Ces signaux solubles sont indissociables des interactions cellules-cellules qui coordonnent l'activation et les actions des cellules NK sur les autres types cellulaires.

1.3.3. Immunorégulation par les cellules NK

Outre les actions effectrices avec des cellules cibles pathologiques, les cellules NK ont de nombreuses interactions avec les autres cellules du système immunitaire. Celles-ci sont souvent réciproques et permettent la coordination des différentes actions du système immunitaire dans son ensemble.

1.3.3.1. Interactions cellules NK - cellules de l'immunité adaptative

Des interactions entre les cellules NK et les cellules du système adaptatif ont parfois été rapportées, notamment avec les lymphocytes T ou B, mais elles restent peu élucidées. Parallèlement à un mécanisme direct de l'IFN γ , il semble que les cellules NK sont en mesure de stimuler la production ainsi que le switch des immunoglobulines après contacts cellulaires avec certains types de **lymphocytes B** [75]. Il semble également que les cellules NK régulent négativement l'immunité **T CD4⁺ et CD8⁺** dans certaines circonstances, par des mécanismes impliquant des contacts cellulaires via les récepteurs NKG2D et DNAM-1 [76].

1.3.3.2. Interactions des cellules NK - cellules de l'immunité innée

Les interactions des cellules NK avec les cellules de l'immunité innée ont pu être montrées chez l'Homme dans différentes situations physiologiques ou pathologiques :

- i) L'étude de la fonctionnalité des cellules NK chez des patients présentant des neutropénies congénitales a permis d'établir que les **Polynucléaires neutrophiles** étaient nécessaires à leur maturation ainsi qu'à leurs fonctions cytotoxiques et de production d'IFN γ [77].
- ii) *In vitro*, des interactions entre cellules NK et **monocytes/macrophages** ont été décrites dans différentes conditions d'activation. Elles impliquent le récepteur activateur NKG2D et ses ligands, notamment MIC-A, dont l'expression est augmentée sur les monocytes/macrophages activés. Ces interactions induisent la production d'IFN γ par les cellules NK [78] ou la lyse des macrophages autologues [79,80].
- iii) Des interactions entre cellules NK et **pDCs** ont été étudiées *in vitro* [81] à partir de cellules de sujets sains ou au cours de différentes infections virales (adénovirus, virus de l'hépatite B ...). En pathologie, il apparaît que l'activation des cellules NK est optimale lorsqu'elles établissent des contacts cellulaires avec les pDCs (les ligands et récepteurs cellulaires mis en jeu n'ont pas tous été identifiés). Ces mécanismes, qui influent sur la cytotoxicité des NK et/ou leurs capacités à produire de l'IFN γ , sont synergiques avec ceux directement engendrés par le virus lui-même et avec la production de certains messagers solubles (cytokines). Il est important de noter que les cellules NK sont aussi en mesure de promouvoir l'activation des pDCs et la production d'IFN α dans certaines conditions de culture.
- iv) Des interactions entre cellules NK et **mDCs (ou dérivées des monocytes)** ont été largement documentées *in vitro*. Ces interactions – qui se dérouleraient au niveau des organes lymphoïdes secondaires et les sites d'inflammation [82,83] - sont réciproques ; on parle alors d'une boucle de co-maturation. Il a ainsi été démontré que :
 - **les cellules NK induisent la maturation des mDCs** lorsqu'elles sont co-cultivées à de faibles ratios et selon des mécanismes faisant intervenir l'IFN γ produit par les cellules NK et des contacts cellulaires (notamment par l'interaction de NKp30 avec son ligand) [84,85]. Ce phénomène est médié par une sous-population de cellules NK CD94/NKG2A⁺ et KIR⁻ [86]. Ceci affecterait également la migration des mDCs vers les sites de l'inflammation (expression de CCR7) où elles initient une réponse immunitaire adaptative [87].

- **les cellules NK peuvent sélectionner les mDCs** : lorsque les co-cultures NK/mDCs sont réalisées à des ratios importants, les cellules NK sont en mesure de lyser les mDCs immatures dont le niveau d'expression de molécules du CMH-I est faible. Cette lyse requiert des contacts cellules-cellules qui impliquent des NCRs et DNAM-1 [88,89].

- **les mDCs activent les cellules NK** selon des mécanismes dépendant de cytokines comme IL12 et des contacts cellulaires faisant intervenir la trans-présentation de l'IL15 ou encore NKG2D [90]. Ces mécanismes stimulent à la fois la production d'IFN γ et la cytotoxicité des cellules NK.

L'ensemble de ces interactions semble jouer un rôle important au cours des infections virales ou au cours de processus tumoraux [91]. Ils pourraient aussi être en jeu au cours de certaines maladies auto-immunes.

Comme cela avait été envisagé initialement puis largement démontré, les cellules NK sont surtout impliquées dans l'immunité antivirale et anti-tumorale. Toutefois, les mécanismes d'activation des cellules NK (reconnaissance du soi ou de situations pathologiques) et également leurs mécanismes d'action (à la fois effecteurs et immunorégulateurs) suggèrent fortement qu'elles puissent être impliquées au cours des maladies auto-immunes, notamment systémiques. Leur rôle au cours de ces maladies doit être envisagé au sein d'un ensemble de réponses immunitaires complexes mais coordonnées, faisant intervenir de nombreux acteurs de l'immunité, avec lesquelles les cellules NK sont susceptibles d'interagir.

2. Maladies auto-immunes

Après avoir exposé brièvement les mécanismes physiopathologiques à l'origine des maladies auto-immunes, certaines d'entre elles seront abordées, en distinguant notamment les formes spécifiques d'organes et les formes systémiques. Deux d'entre elles seront décrites sur le plan de la physiopathologie, de la clinique et de la thérapeutique car elles sont l'objet du travail portant sur l'implication des cellules NK.

2.1. Généralités sur les maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes sont le résultat d'une rupture de tolérance au soi.

2.1.1. Mécanismes aboutissant à la rupture de tolérance au soi

La fonction du système immunitaire est de distinguer le soi du non soi. Pour être en mesure de défendre un organisme contre 10^{12} antigènes potentiels, le système immunitaire développe un répertoire immunitaire au moins partiellement dirigé contre des antigènes du soi. Si physiologiquement des réactions auto-immunes ont lieu régulièrement dans un organisme (comme en témoignent l'existence de lymphocytes T ou B auto-réactifs et d'auto-anticorps naturels [92]), celles-ci n'aboutissent que très rarement à des situations pathologiques, c'est à dire à des lésions tissulaires. En effet, pour engendrer une réponse immunitaire capable de discriminer le soi du non-soi, il est nécessaire de franchir toutes les étapes immunologiques nécessaires (reconnaissance, présentation, co-stimulation, activation et prolifération etc...). A chacune de ces étapes des contrôles sont mis en place (mécanismes de tolérance au soi) [93]. Il faut donc au moins qu'un de ces mécanismes soit défaillant, inhibé ou activé, pour qu'une réaction auto-immune se développe et engendre des lésions au point qu'on parle de « rupture de tolérance ». Ces défauts sont multiples : ils peuvent être génétiques [94] ou acquis. On distingue classiquement les mécanismes dits de tolérance centrale et de tolérance périphérique [95].

2.1.1.1. Les mécanismes de tolérance centrale

Ils concernent l'immunité adaptative : lors de leur maturation, les lymphocytes T et B auto-réactifs sont normalement éliminés dans le thymus et la moëlle osseuse, respectivement. S'il existe des anomalies de sélection positive ou négative de ces cellules, des clones lymphocytaires auto-réactifs spécifiques du soi émergeront [95].

Un tel mécanisme est en cause par exemple au cours du syndrome APECED (*Auto-immune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy*) : il s'agit d'un déficit immunitaire associé à des manifestations auto-immunes multiples. La cause de ce syndrome est génétique, en rapport avec une mutation du gène AIRE (*Auto-Immune REgulator*) [96] dont le rôle est de faire s'exprimer dans le thymus des molécules du soi, et d'orchestrer ainsi la sélection négative des clones T auto-réactifs [97]. On peut noter que ces mécanismes ne sont pas ceux qui priment dans les différentes maladies auto-immunes qui sont le sujet de ce travail.

De même, lors de leur maturation dans la moëlle osseuse, les lymphocytes B réarrangent leurs chaînes lourdes et légères, sous l'influence des protéines RAG (*Recombination Activating Gene*), pour aboutir en situation physiologique à un vaste répertoire B primaire [98]. Au fur et à mesure que ces derniers ont lieu, la fonctionnalité et l'auto-réactivité du BCR (*B cell receptor*) sont testés : si le BCR est auto-réactif, plusieurs mécanismes de tolérance centrale peuvent être mis en place : les lymphocytes pro-B et pré-B peuvent subir une apoptose (délétion clonale), migrer tout de même en périphérie mais être anergiques ou ignorants ou encore subir un blocage de maturation. Dans ce dernier cas, l'expression des protéines RAG est alors maintenue et permet de nouveaux réarrangements de chaînes légères (voire même lourdes), selon un processus appelé « correction du récepteur » ou « *receptor editing* », qui ont lieu jusqu'à ce que le BCR ne soit plus auto-réactif. La maturation du lymphocyte pré-B et son passage en périphérie redevient alors possible [98]. Des anomalies de ce mécanisme ont été mises en cause au cours de certaines maladies auto-immunes, comme le Lupus Systémique [98].

2.1.1.2. Mécanismes de tolérance périphérique

Ces mécanismes sont nombreux et ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, les organes initiateurs ou cibles des maladies auto-immunes ou dans le sang périphérique. Parmi les défaillances de ces mécanismes qui engendrent de l'auto-

immunité, certaines affectent l'**immunité adaptative humorale** (*lymphocytes B*) [99]. On décrit ainsi :

- i) Des anomalies de correction du BCR (« **receptor revision** ») qui affectent les lymphocytes B matures auto-réactifs ayant rencontré un antigène et ayant donc procédé en périphérie à des réarrangements secondaires [100].
- ii) Des perturbations du **réseau idiotypique** avec dérégulation du contrôle des effets des auto-anticorps, comme survenant au cours des anémies hémolytiques auto-immunes [97] ou au cours du Lupus Systémique.
- iii) Des **mimétismes moléculaires** peuvent exister entre une protéine constitutive d'une bactérie par exemple (*Campylobacter jejuni*) et une protéine du soi. Cela se rencontre au cours du Syndrome de Guillain-Barré (polyradiculonévrite aiguë auto-immune) : les anticorps reconnaissant la bactérie vont aussi avoir des propriétés auto-immunes en ayant également pour cible des gangliosides (anticorps anti-gangliosides) [101].
- iv) Un **défait d'apoptose** d'un clone lymphocytaire B qui devient majoritaire et peut être auto-réactif et entraîner des cytopénies auto-immunes, comme c'est possible au cours des leucémies lymphoïdes chroniques [102].
- v) Une modulation de l'affinité entre le **récepteur au fragment Fc des immunoglobulines** (dont il existe plusieurs sous-types) et son ligand modifie l'activation de certaines cellules immunitaires et favorise secondairement des réactions auto-immunes [103], comme cela a été suggéré au cours du Lupus Systémique.

D'autres anomalies dans les mécanismes de tolérance affectent l'**immunité adaptative cellulaire** (*lymphocytes T*) [93]:

- i) Outre l'**ignorance**, l'**anergie** ou la **délétion périphérique** de clones T auto-réactifs [104], un des mécanismes de tolérance principal est l'inhibition de la réponse immunitaire par les **lymphocytes T régulateurs** (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Un déficit de ces cellules peut engendrer de l'auto-immunité : ceci a été montré au cours du syndrome IPEX (*Immune dysfunction Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked syndrome*), une maladie génétique portant sur le gène FoxP3 qui aboutit à un déficit immunitaire et au développement de manifestations auto-immunes [105]. De même, au cours de maladies auto-

immunes comme le Lupus Systémique, on a pu montrer qu'il existait un déficit acquis et relatif de cette population lymphocytaire T régulatrice [106].

- ii) Un déficit génétique des voies d'apoptose FAS/FAS-ligand entraîne des anomalies de l'homéostasie des lymphocytes T avec lymphoprolifération : c'est le cas de l'ALPS (*Auto-immune LymphoProliferative Syndrome*), au cours duquel des manifestations auto-immunes peuvent survenir, notamment des cytopénies auto-immunes [107,108]. D'autres **lymphoproliférations T** indolentes peuvent également s'associer à des manifestations auto-immunes, comme le Syndrome de Felty (Polyarthrite Rhumatoïde associée à des cytopénies auto-immunes) [109].
- iii) La **polarisation des lymphocytes T naïfs** (TH0) est un événement immunologique important qui peut également favoriser la rupture de tolérance au soi. En effet, selon la nature des différents signaux reçus lors de la présentation antigénique, un lymphocyte T pourra s'orienter vers une différenciation TH17 [110,111], qui favorise via l'IL17 la survenue de diverses maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, la sclérodermie systémique ou le Lupus Systémique [112]. Plus généralement, une présentation antigénique très efficace [104], favorisée par différents haplotypes ou polymorphismes des molécules du CMH-I, favorise par exemple la réaction inflammatoire et l'auto-immunité.

L'**immunité innée** (cellules phagocytaires et présentatrices d'antigènes ou molécules solubles telles que le complément) intervient également dans les mécanismes de tolérance au soi. En effet, les capacités à répondre en première ligne à des « signaux de danger » émanant du soi ou d'agents extérieurs par le système immunitaire inné sont des éléments qui peuvent influencer sur la survenue de manifestations auto-immunes. Ainsi, l'activation et l'augmentation du nombre des cellules dendritiques semblent jouer un rôle dans la genèse du Lupus Systémique [104].

Le rôle des cellules NK dans la rupture de tolérance a été beaucoup moins exploré. Pourtant ces cellules sont fortement impliquées dans la reconnaissance du soi (« *missing self recognition* »). Dès lors, des mécanismes de dérégulation concernant par exemple des déséquilibres entre les KIR inhibiteurs et les activateurs seraient susceptibles de favoriser la survenue de maladies auto-immunes : cela n'a pour l'instant surtout été documenté qu'au cours de pathologies inflammatoires [113,114].

De plus, le caractère immuno-régulateur des cellules NK vis à vis d'autres cellules immunitaires pourraient également favoriser la survenue de maladies auto-immunes.

2.1.2. Maladies auto-immunes systémiques ou spécifiques d'organe

Il est habituel de distinguer parmi les maladies auto-immunes, celles qui affectent un seul organe, ou même une seule fonction d'un organe donné, de celles qui au contraire vont s'exprimer dans différents organes [104]. Cette dichotomie entre maladies auto-immunes spécifiques d'organes et systémiques dépend de la cible de la réponse auto-immune. En effet, lorsque cette dernière est spécifique d'un antigène exprimé dans un seul organe, seul celui-ci sera atteint. C'est le cas par exemple de :

- i) **maladies neurologiques** comme la sclérose en plaques (réponse dirigée contre la myéline du système nerveux central), de la myasthénie (anticorps anti-récepteurs de l'acétylcholine ou muscariniques, exprimés au niveau de la plaque motrice),
- ii) **maladies endocrinologiques** telles que les dysthyroïdies (anticorps anti-récepteurs de la TSH ou anti-thyropéroxydase), certaines formes de diabète (anticorps anti-ilôts, anti-insuline, anti-IA2 ou encore anti-glutamate acide decarboxylase),
- iii) **affections dermatologiques** au cours desquelles on retrouve des anticorps anti-kératinocytaires (pemphigus) ou dirigés contre des protéines de l'hémi-desmosome (pemphigoïde bulleuse).
- iv) **maladies hématologiques** comme l'hémophilie acquise liée à la présence d'anticorps anti-Facteur VIII ou les cytopénies auto-immunes (purpura thrombopénique immunologique, neutropénie ou anémie hémolytique auto-immunes).

Inversement, au cours des maladies auto-immunes systémiques telles la **Sclérodémie Systémique**, le **Syndrome de Gougerot-Sjögren**, la **Polyarthrite Rhumatoïde** (*Figure 6*), le **Lupus Systémique** ou encore les **myopathies inflammatoires**, les auto-anticorps présents sont dirigés contre des composants ubiquitaires, communs à tous les types cellulaires [115]. On distingue ainsi les anticorps anti-nucléaires : anti-antigènes nucléaires solubles ou anti-ADN ; les anti-centromères et anti-télomères, les anti-peptides citriques citrullinés (anti-CCP) ou

Sclérodermie Systémique



Cette pathologie -dont il existe des formes localisées ou systémiques- comporte 3 axes physiopathologiques:

Fibrose cutanée et viscérale, avec activation des fibroblastes (rôle du TGF β) et accumulation tissulaire de collagène, d'où

Sclérodactylie, et Fibrose pulmonaire

Atteinte microvasculaire sclérosante, avec activation précoce des cellules endothéliales puis rigidification des tuniques artérielles, d'où

Phénomène de Raynaud, Ulcérations digitales, HTAP, Crise rénale

Auto-immunité avec notamment activation lymphocytaire B et production d'auto-anticorps anti-centromères, anti-télomères ou anti-ARN-polymérase III.

Syndrome de Gougerot-Sjögren



Ce syndrome -dont on distingue les formes primitives ou associées à d'autres connectivites est caractérisé par l'infiltration **des glandes exocrines** (salivaires, lacrymales...) par des **lymphocytes B** auto-réactifs, d'où

Syndromes secs (ophtalmique et/ou buccal).

L'infiltration lymphocytaire peut s'étendre à différents organes et engendrer :

Pneumopathie Lymphocytaire, Néphropathie interstitielle, Atteintes neurologiques périphériques ou centrales, Polyarthrite.

Il existe un risque évolutif vers des **proliférations lymphocytaires B clonales**.

Sérologiquement, le syndrome est caractérisé par la production d'**auto-anticorps** : anti-Ro/SSA et anti-La/SSB.

Polyarthrite Rhumatoïde



Il s'agit du **rhumatisme inflammatoire** le plus fréquent dans la population générale.

L'**atteinte articulaire** est volontiers de type **oligo- ou polyarthrite**, préférentiellement distale et symétrique (mains, poignets notamment). Les **synovites** sont également fréquentes. Ces atteintes entraînent, en l'absence de traitement, des **érosions** et des **déformations** articulaires progressives et invalidantes.

Des manifestations extra-articulaires peuvent survenir:

Sclérite, Fibrose pulmonaire, Pleuro-Péricardite, Atteintes valvulaires cardiaques, voire Vascularite.

Du point de vue immunologique la maladie se caractérise par une inflammation synoviale et systémique, avec une hyper-production de TNF α .

On retrouve la présence d'**auto-anticorps**: Facteur Rhumatoïde et anticorps anti-CCP.

Figure 6 : Connectivites auto-immunes

Brèves descriptions de trois maladies auto-immunes systémiques particulières : Sclérodermie systémique (HTAP = Hypertension Artérielle Pulmonaire), Syndrome de Gougerot-Sjögren et Polyarthrite Rhumatoïde (anti-CCP = anti-peptides citriques citrullinés).

encore les anti-ARNt-synthétases. Dans tous ces cas précis, la cible antigénique étant présente dans toute cellule, tous les organes peuvent potentiellement être atteints.

Il est important de noter toutefois que la distinction entre le caractère « systémique » et « spécifique d'organe » est discutable. En effet, certaines maladies auto-immunes sont considérées comme systémiques (entraînant directement ou indirectement des lésions dans plusieurs organes) alors que la cible antigénique est spécifique d'un organe ou d'un organelle particulier. On peut ainsi citer les microangiopathies thrombotiques avec anticorps anti-ADAMTS-13 (protéase clivant le facteur von Willebrand), ou les vascularites avec anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA). Dans ces deux cas, les lésions engendrées par les auto-anticorps étant vasculaires, l'expression de la maladie prend un caractère systémique. De même, on peut citer la carence en vitamine B12 consécutive à l'existence d'anticorps anti-Facteur Intrinsèque (Anémie de Biermer), qui est à l'origine d'une anémie mais également d'un déficit neurologique.

D'autre part, dans certaines maladies auto-immunes considérées comme systémiques (avec auto-anticorps effectivement dirigé contre un antigène ubiquitaire) ne concernent qu'un seul organe (le muscle au cours des myopathies nécrosantes avec présence d'anticorps anti-HMG-coA réductase ou le foie au cours des hépatites auto-immunes avec des anticorps anti-actine). Dans ces cas précis, le fait que tous les organes ne soient pas atteints traduit la complexité d'une réponse immune, qui ne dépend pas uniquement de la présence d'une cible antigénique. En effet, pour que la réaction immunitaire puisse se mettre en place, il est nécessaire qu'un antigène soit accessible, correctement présenté au système immunitaire et qu'il soit reconnu comme un « danger ».

De plus, les différentes maladies auto-immunes, spécifiques ou systémiques, peuvent s'associer entre elles. Ceci traduit non seulement un terrain prédisposant partagé et également des mécanismes physiopathologiques sinon communs, au moins proches (qu'ils soient majoritairement médiés par les auto-anticorps ou par l'immunité lymphocytaire T).

Les patients qui présentent une maladie auto-immune spécifique sont majoritairement adressés à un médecin spécialiste d'organe. L'interniste quant à lui est amené à prendre en charge des patients atteints de maladies auto-immunes systémiques. Des motivations personnelles pour ces maladies auto-immunes et la

présence des centres de référence français du Lupus Systémique et des Myopathies Inflammatoires à l'Hôpital de La Pitié-Salpêtrière, ont favorisé l'étude des mécanismes de l'auto-immunité systémique à travers ces deux exemples précis.

2.2. Lupus Systémique

Le Lupus Systémique est classiquement considéré comme le prototype de la maladie auto-immune systémique. Il s'agit d'une maladie à la physiopathologie complexe, incomplètement comprise, se traduisant sur le plan clinique par des phénotypes divers.

2.2.1. Epidémiologie

On considère qu'il s'agit d'une maladie rare dont la prévalence en France est estimée à **47 cas pour 100 000** (ce qui est un peu inférieur à ce qui a récemment été évalué aux états unis [116,117]). Le Lupus Systémique touche donc près de 25000 personnes en France. Il s'agit dans 9 cas sur 10 de femmes âgées le plus souvent de 15 à 45 ans (c'est à dire en période d'activité génitale).

2.2.2. Données cliniques

Bien que contrôlable par les traitements, le Lupus Systémique est une maladie chronique, qui évolue par alternance de poussées et de phases de rémission, plus ou moins prolongées. Contrairement au Lupus Cutané, il ne se limite pas à la peau mais peut atteindre tous les organes [118]. Les manifestations cliniques sont polymorphes : les organes les plus souvent atteints sont la peau et les muqueuses, les articulations, les reins et les séreuses (péricarde et plèvre notamment). Le système nerveux central et les lignées cellulaires hématologiques sont plus rarement concernés. Ces atteintes ne surviennent pas chez tous les patients; et pour un même patient, elles peuvent survenir à des moments différents du développement de la maladie. Du fait de cette hétérogénéité, des critères de classification ont été proposés et validés. Ils ont été récemment actualisés par les sociétés savantes, dont la société américaine de rhumatologie [119]. On considère qu'un patient doit cumuler concomitamment ou

Table 2 : Présentation des différents auto-anticorps associés au Lupus Systémique (LS).

* : comprend les anti- β 2GPI, anti-cardiolipides et anticoagulant circulant (anti-prothrombinase),
 SS : Syndrome de Gougerot-Sjögren, kDa : kilo-Dalton, Caractère gras : dépistable en pratique courante.

D'après Gatto M & al. Autoimmunity Reviews, 2013.

Spécificité Antigénique		Prévalence	Remarques
Dirigés contre la chromatine et ses composants	Anti-ADN double brin	75%	Grande spécificité (Test de Farr), association avec activité LS et atteinte rénale
	Anti-ADN simple brin		Sensibilité >> Spécificité
	Anti-ARN		
	Anti-Nucléosomes	> 60%	Association avec l'atteinte rénale
	Anti-Histones	50%	Association avec les formes induites par les médicaments
Dirigés contre des antigènes nucléaires solubles	Anti-Sm	30%	Grande Spécificité
	Anti-Ro/SSA 52 kDa		Signification pathologique remise en question, Très mauvaise spécificité
	Anti-Ro/SSA 60 kDa	40%	
	Anti-La/SSB	20%	Non spécifique (SS), Associé avec le bloc auriculoventriculaire congénital
Autres spécificités	Anti-U1-RNP		Peu spécifique (Connectivite Mixte: myosite, atteintes pulmonaires)
	Anti-Phospholipides*	30%	Associé avec des thromboses artérielles, Veineuses et/ou capillaires et des complications obstétricales
	Anti-Ribo-P	25	Atteintes neurologiques ?
	Anti-C1q	40%	Association avec l'atteinte rénale
	Anti-Plaquettes/GR	-	Non spécifiques, responsables de cytopathies auto-immunes
	Anti-NMDA-R	-	Atteintes neurologiques (encephalites limbiques etc...)
	Anti-alpha-Actinine	20%	Association avec l'atteinte rénale
	Anti-LL37		Données très préliminaires

successivement quatre événements (*Annexe 1 & 2*), dont au moins un clinique et un immunologique pour être classé comme « Lupus Systémique ».

Du point de vue sérologique, le Lupus Systémique est caractérisé par la présence d'auto-anticorps anti-nucléaires (dépistés par immunofluorescence indirecte sur une lignée cellulaire tumorale : HEp-2). Cette technique sensible mais peu spécifique permet de dépister des anticorps ayant différentes cibles antigéniques (*Table 2*). Ils sont ainsi dirigés contre la chromatine et ses constituants : c'est le cas par exemple des **anticorps anti-ADN double brin** ou des anticorps dirigés contre différentes ribonucléoprotéines que l'on regroupe sous le terme d'anti-antigènes nucléaires solubles [118]. La spécificité des ces auto-anticorps pour le Lupus Systémique est variable : les anti-ADN double brin par test de Farr sont les plus spécifiques. De plus, ils sont corrélés à l'activité de la maladie. Souvent associés entre eux, ces différents auto-anticorps témoignent de la grande variété des auto-antigènes anormalement générés au cours de la maladie. Certaines corrélations immuno-cliniques (c'est à dire entre certaines atteintes d'organes et certaines spécificités antigéniques) pourraient exister [120,121]. Néanmoins, qualitativement, les auto-anticorps ont une valeur prédictive qui est bien inférieure à leur valeur diagnostique.

Le pronostic du Lupus Systémique est variable selon les organes atteints [118]: ainsi les atteintes du système nerveux central, du myocarde ou plus fréquemment des reins, sont associés à des pronostics plus sévères. Les atteintes dermatologiques et rhumatologiques (non destructrices), peuvent être retentissantes sur le plan de la qualité de vie mais sont moins graves, puisqu'elles ne mettent pas en jeu le pronostic vital des patients. Malgré le développement de scores clinico-biologiques témoignant de l'activité du Lupus Systémique, comme le *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI)-2K (*Annexe 3*), l'évolution dans le temps reste imprévisible. Le suivi des patients doit donc être prolongé et les traitements adaptés avec précision.

Grâce aux progrès dans la prise en charge thérapeutique globale et médicamenteuse des patients atteints de Lupus Systémique ces 2 dernières décades, le pronostic de la maladie s'est considérablement amélioré, avec des taux de survie atteignant actuellement plus de 95% à dix ans [122].

2.2.3. Facteurs favorisants

Si le Lupus Systémique est une maladie rare, c'est parce qu'elle est multifactorielle. Il faut le concours de nombreuses circonstances pour que les points du contrôle physiologique de la tolérance au soi soient dépassés et que ces phénomènes deviennent pathologiques au point que la maladie se manifeste cliniquement [118,122,123]. Il faut ainsi noter que la présence des marqueurs sériques de la maladie n'est pas nécessairement synonyme de Lupus Systémique. Ainsi, les anticorps anti-nucléaires dans leur ensemble peuvent être positifs chez des sujets cliniquement sains. Dans certaines circonstances même (sujets âgés et/ou bénéficiant d'un traitement par bêta-bloquants par exemple) la prévalence de certains de ces marqueurs dans la population peut atteindre 5%. De plus, il a été montré que ces marqueurs précédaient, parfois de plusieurs années, la survenue d'un Lupus Systémique clinique [124].

Ces facteurs favorisants sont d'ordres hormonaux et environnementaux. Leur part dans la genèse et/ou l'entretien de la maladie est très différente d'un individu à l'autre et ils peuvent parfois ne pas être retrouvés.

- i) Les facteurs hormonaux correspondent aux **œstrogènes** [122]. L'effet des œstrogènes est évident du point de vue épidémiologique (majorité de femmes atteintes, fréquence du diagnostic et fréquence de survenue des poussées pendant la période d'activité génitale ; influence de la grossesse, de la contraception oestro-progestative ou même des traitements hormonaux utilisés en post-ménopause [125] sur l'activité de la maladie. Néanmoins, les mécanismes par lesquels ils activent le système immunitaire ne sont qu'incomplètement élucidés. Ils pourraient favoriser la production d'IFN α par les pDCs [126] ou l'activation des lymphocytes B [55].
- ii) D'autres facteurs environnementaux jouent un rôle majeur, comme l'exposition solaire : au delà de la survenue d'un rash photosensible, les **rayons ultra-violets** entraîneraient une apoptose kératinocytaire, source d'auto-antigènes [122].
- iii) Certains **médicaments** (antihypertenseurs, antiarythmiques, anticonvulsivants, antibiotiques...), probablement sur des terrains déjà prédisposés, peuvent aussi induire la survenue de Lupus Systémique. Certains de ces traitements entraîneraient des dérégulations épigénétiques, comme une déméthylation de l'ADN [118,123].

- iv) Des facteurs infectieux, comme le **virus Epstein-Barr** (EBV) pourraient être impliqués dans le Lupus Systémique chez l'Homme [127]. Dans des modèles murins, il a été montré que l'EBV induit un Lupus Systémique via des mécanismes de type « mimétisme moléculaire » [128].

2.2.4. Immunopathologie du Lupus Systémique

2.2.4.1 Données générales

L'immunopathologie du Lupus Systémique est particulièrement complexe car de nombreux mécanismes sont impliqués et concernent toutes les phases de la réaction immune. De plus, la plupart d'entre eux sont intriqués et il existe des « mécanismes de ré-entrée », c'est à dire que la conséquence d'un phénomène peut aussi entretenir ce dernier, en devenant aussi sa cause. Il est donc nécessaire de schématiser les principaux mécanismes de la maladie avant de détailler certains d'entre eux, qui seront directement en lien avec les objectifs de ce travail.

- i) **Genèse** : bien qu'ils ne soient qu'incomplètement compris, les phénomènes initiateurs du Lupus Systémique à l'origine de la rupture de tolérance, sont l'exposition « en contexte de danger » d'antigènes du soi. Ces auto-antigènes correspondent à du matériel nucléaire et/ou ribonucléoprotéique. Ils sont la conséquence d'une mort cellulaire anormale, excessive et/ou d'anomalie de clairance des microparticules ainsi générées (vésicules apoptotiques, NETs...) qui contiennent des auto-antigènes et d'autres molécules immunogènes [129,130]. Les causes de ces dérégulations sont mal connues.
- ii) **Activation du système immunitaire** : dans le contexte précis du Lupus Systémique, le matériel nucléaire et/ou ribonucléoprotéique est immunogène et aboutit à l'activation de cellules de l'immunité innée (comme les polynucléaires neutrophiles [131], les monocytes/macrophages [132] ou les cellules dendritiques [133,134]) ainsi qu'à la production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFN α . Il en résulte une différenciation des mDCs [135] puis une activation lymphocytaire T spécifique, CD4⁺ et CD8⁺, concomitamment à une activation de lymphocytes B polyclonale, qui peut être directe ou T CD4⁺ dépendante [136],

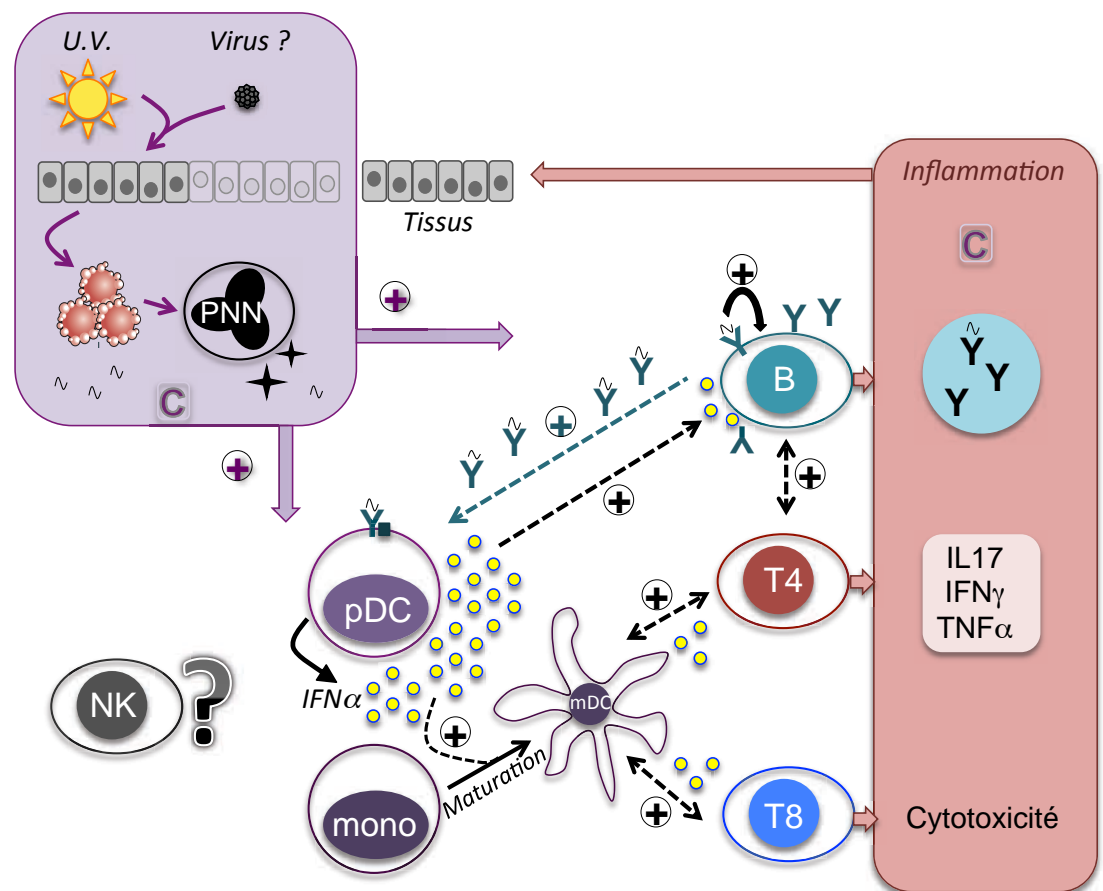


Figure 7 : Vue schématique des événements immunologiques impliqués au cours du Lupus Systémique.

Du fait de différents « facteurs de stress », une mort cellulaire et des microparticules sont générées. Celles-ci sont immunogènes et activent différentes molécules (C=Complément) et cellules immunitaires innées (PNN= Polynucléaires neutrophiles ; pDC = cellule dendritique plasmacytoïde) et lymphocytes B. Cela aboutit notamment à la production massive d'IFN α , notamment par les pDCs. Cette cytokine favorise la maturation des cellules présentatrices d'antigène (mDC= cellule dendritique myéloïde, B= lymphocyte B) et l'activation du système immunitaire adaptatif (T8= lymphocyte T CD8⁺ cytotoxique, T4= lymphocyte CD4⁺, lymphocytes B). Ces derniers produisent des auto-anticorps, qui sous la forme de complexes immuns circulants sont également très immunogènes. Des lésions tissulaires sont engendrées directement (cytotoxicité) ou indirectement (production de cytokines et d'auto-anticorps). La place des cellules NK (NK) est mal comprise.

comme en témoignent la production d'auto-anticorps d'isotype G ayant subi des commutations isotypiques [137]. L'activation de toutes ces cellules immunitaires en réponse à ces stimuli est « physiologique ». Toutefois, au cours du Lupus Systémique, elle est volontiers quantitativement anormale au point de devenir pathologique. Ceci est la conséquence de modifications d'expression de diverses molécules impliquées dans leurs fonctionnalités (récepteurs membranaires ou cellulaires, molécules liées à la transduction d'un signal, molécules de co-stimulation...), dont la cause est souvent en rapport avec des anomalies intrinsèques [138].

iii) **Lésions** : l'activation du système immunitaire au cours du Lupus Systémique aboutit à des destructions tissulaires directement ou indirectement. Celles-ci sont elles-mêmes en mesure d'entretenir les phénomènes auto-immuns. En effet, les lymphocytes T auto-réactifs infiltrer les tissus :

- Les lymphocytes T CD8⁺ expriment des molécules cytotoxiques et induisent directement les lésions tissulaires [139].
- Les lymphocytes T CD4⁺ exercent une activité auxiliaire sur les lymphocytes B et sécrètent différentes cytokines inflammatoires (comme IFN γ , IL6 ou IL17 [112]).
- Les lymphocytes B, dont il existe un plus grand nombre de formes auto-réactives [140], ont une grande capacité à produire différents auto-anticorps, témoins sériques de la rupture de tolérance [136]. Ces derniers sont eux-mêmes délétères, notamment par le fait d'anomalies constitutives, qui concernent par exemple leur clairance par les récepteurs Fc γ RII. Sous forme de complexes immuns (complexes moléculaires associant auto-anticorps avec auto-antigènes), ces auto-anticorps sont en mesure d'activer directement les cellules immunitaires (pDCs et certains lymphocytes B, notamment) par des voies différentes [141,142]. Ils peuvent aussi engendrer de l'inflammation tissulaire en activant la voie classique du complément et en recrutant les cellules inflammatoires localement, dans les organes cibles où ils se déposent (comme le rein par exemple) [122].

A leur tour, ces cellules dégradent les tissus en générant une mort cellulaire, des microparticules et des auto-antigènes, qui entretiennent les phénomènes auto-immuns.

Il est important de noter que parmi tous ces acteurs immunologiques, l'implication des cellules NK reste peu étudiée.

2.2.4.2. Phénomènes initiateurs

Il semble que le Lupus Systémique soit initié du fait d'anomalies de l'**apoptose** (mort cellulaire programmée) : plus qu'une simple augmentation de celle-ci au décours d'une infection virale ou du fait de la toxicité anormale des rayons ultraviolets sur les kératinocytes [143], il semble que ce soit des anomalies de clairance des cellules apoptotiques qui soit à l'origine de la maladie [144–146]. Pour des raisons mal connues sur le plan moléculaire, cette clairance est mal assurée par les protéines du complément, comme le C1q [147–149] et par les cellules phagocytaires myéloïdes, comme les monocytes/macrophages ou les cellules dendritiques. Au lieu d'être complètement détruites pour que leur matériel nucléaire soit dégradé et recyclé (par des DNases et des RNases), elles subissent une **nécrose secondaire** qui serait la cause du relargage de nombreux composants cellulaires (vésicules apoptotiques ou « *apoptotic blebs* ») qui contiennent surtout des acides nucléiques fortement acétylés. Ces derniers existent sous différentes formes et se comportent comme des auto-antigènes très immunogènes [150].

Il est intéressant de rapprocher ces phénomènes de ceux qui sont décrits au cours des interféronopathies de type I [151], comme le *Syndrome d'Aicardi-Gouttière* : une maladie génétique à début pédiatrique, révélée par une symptomatologie proche du Lupus Systémique (avec atteinte neurologique). Ce syndrome est lié à différentes mutations de gènes impliqués dans le catabolisme intra-cytoplasmique des acides nucléiques (exonuclase TREX1, ribonucléases RNASEH2, deoxynucléoside hydrolases SAMHD1 ou Adénosine déaminase ADAR1). Au cours de ce syndrome, les acides nucléiques intracytoplasmiques s'accumulent et sont responsables, comme au cours du Lupus Systémique, de l'activation secondaire du système immunitaire dans son ensemble, via la voie de l'IFN α .

En effet, les auto-antigènes nucléaires –avec l'aide de molécules pro-inflammatoires contenues dans les vésicules apoptotiques (ou microparticules)- sont en mesure de stimuler les différentes cellules immunitaires [152]. Si l'auto-antigène « primaire » semble être le **nucléosome** (fragment d'ADN lié aux histones et à HMGB1 : *high mobility group protein B1*), d'autres auto-antigènes vont rapidement exister au cours du Lupus Systémique sous forme :

- de **fragments d'ADN complexés** à des protéines bactéricides (comme la cathélicidine LL37 ou l' HNP : *Human Neutrophil peptide*), qui sont relargués par les polynucléaires neutrophiles (NETs) [153,154].

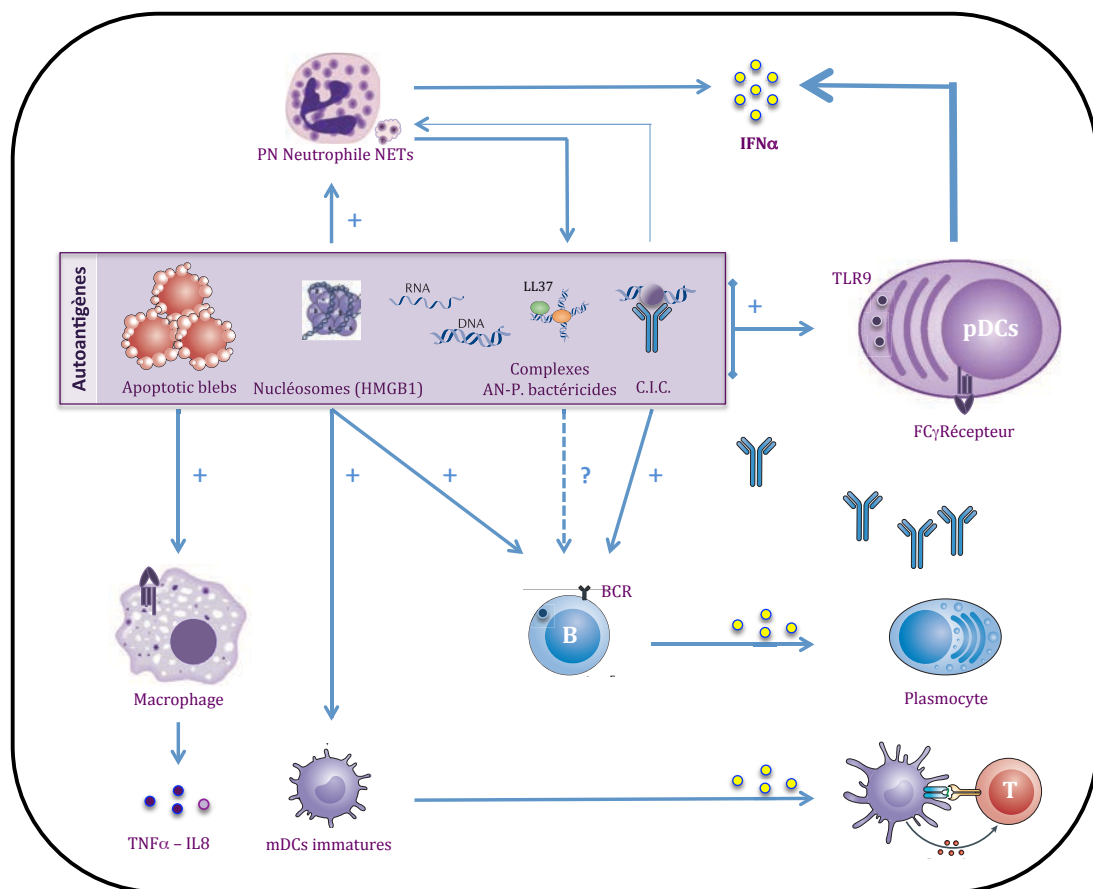


Figure 8 : Schématisation des phénomènes initiant la production d'IFN α au cours du Lupus Systémique.

Les auto-antigènes responsables du Lupus Systémique sont produits du fait d'une apoptose accrue et/ou d'une clairance insuffisante des cellules apoptotiques, qui subissent une nécrose secondaire. Cette dernière engendre des microparticules qui activent la production de cytokines pro-inflammatoires par les Macrophages. Des acides nucléiques – complexifiés avec différentes protéines (HMGB1 = High mobility group protein B1 ; LL37 = human cathelicidin)- sont relargués et activent les polynucléaires neutrophiles, qui vont être la source supplémentaire d'auto-antigènes (par la formation de NETs). Surtout, les pDCs et les lymphocytes B auto-réactifs sont activés essentiellement par les complexes immuns circulants (CIC) via TLR9 situé dans le compartiment endosomal, ce qui nécessite l'internalisation par le Fc γ RIIa (Récepteur au fragment Fc des immunoglobulines de type IIa) et le BCR (*B cell receptor*), respectivement. Les pDCs ont un rôle majeur et sont la source principale d'IFN α (10^9 molécules par cellule par 24h). Cette cytokine clef, associée à l'action des auto-antigènes, est capable d'activer le système immunitaire adaptatif.

- de **complexes immuns circulants**, constitués lorsqu'un auto-antigène a rencontré l'immunoglobuline spécifique qui lui correspond et qui est produite par les lymphocytes B auto-réactifs [155]. Ceux-ci peuvent être couplés aux protéines bactéricides [153,156].

- d'**acides nucléiques « nus »** : bien qu'il existe une augmentation de la quantité d'ADN-circulants libres et que ceux-ci sont volontiers hypométhylés au cours de la maladie, ces acides nucléiques « nus » semblent peu immunogènes [150,157].

Sous ces trois différentes formes immunogènes, les auto-antigènes vont donc activer le système immunitaire dans son ensemble, selon des voies dépendant ou non des différents « récepteurs de dangers » cellulaires : comme PRRs, dont font partie les TLRs [158]. Ces différents mécanismes sont complexes, interdépendants et concomitants : il est donc difficile de les hiérarchiser. Néanmoins, on peut schématiser les différents éléments qui semblent impliqués (*Figure 8*) :

Les nucléosomes ont une action directe sur :

- i) Les **macrophages** (au même titre que les vésicules apoptotiques) : action qui est TLR9-indépendante et aboutit à la production de cytokines pro- inflammatoires (TNF α et IL8 notamment).
- ii) Les **polynucléaires neutrophiles** : action qui est TLR9-indépendante et aboutit à la production d'IFN α et de NETs [131].
- iii) Les **mDCs** : action qui semble être TLR9-indépendante [159] et qui aboutit à l'activation et la maturation de celles-ci, stimulant la présentation antigénique et donc l'immunité adaptative via les lymphocytes T.

Les auto-antigènes contenus dans les **NETs** (acides nucléiques complexés aux protéines bactéricides) sont quant à eux capables d'activer la production d'IFN α par les **pDCs** par des mécanismes majoritairement TLR9-dépendants [153,156].

L'activation des lymphocytes B et la formation des **complexes immuns circulants**, entretiennent et accentuent l'activation des cellules immunitaires selon différents mécanismes, le plus souvent dépendants de TLR9. C'est sous cette forme, portés par les immunoglobulines, que les auto-antigènes sont les plus immunogènes. Ils activent :

- i) Les **mDCs** [160]
- ii) Les **pDCs**, dont les capacités de production d'IFN α vont être exponentiellement amplifiées. Ces mécanismes TLR9-dépendants sont détaillés ci-après.

- iii) et certains **lymphocytes B** qui expriment TLR9 [161,162], selon le même mode d'activation, T CD4⁺ indépendant [157,163].
- iv) De plus, ils entretiennent la formation de NETs par les **polynucléaires neutrophiles** [164], ce qui pérennise la boucle d'activation.

2.2.4.3. Un mécanisme central : l'activation des pDCs via TLR9

Au cours du Lupus Systémique, les différents acides nucléiques engendrés sont donc en mesure d'activer un certain nombre de voies cellulaires dans différents types cellulaires, grâce à leurs liaisons à des PRRs. Parmi ces voies d'activation, de nombreux travaux (notamment des modèles murins), ont permis de montrer que les voies qui impliquent les TLR7 et TLR9 sont primordiales, notamment au niveau de la pDC [165]. Pour être immunogènes, les acides nucléiques doivent rencontrer leurs ligands, qui sont en l'occurrence intracellulaires. L'internalisation des auto-antigènes au cours du Lupus Systémique est facilitée par la liaison des acides nucléiques avec les différentes protéines concomitamment libérées lors des différents modes de mort cellulaire comme LL37 [153,154,166], HMGB1 [167] ou à des immunoglobulines spécifiques. L'internalisation peut se faire via des mouvements lipidiques ou des récepteurs membranaires : comme le FcγRIIa pour les complexes immuns circulants [153,155,156]. Bien que plusieurs modes d'internalisation aient successivement été décrits (phagocytose ou endocytose), tous permettent la liaison dans ce compartiment cellulaire des acides nucléiques avec leur TLR correspondant, par exemple l'ADN double brin avec TLR9. Au niveau des pDCs, il s'ensuit une cascade d'activation des voies de signalisation passant par MyD88, NFκB puis IRF7 (*Figure 9*) [168], qui aboutit à la production massive et rapide d'IFNα [55] puis à l'activation globale du système immunitaire.

On peut noter que ce mécanisme est également un des modes d'activation des lymphocytes B. Dans ce cas, il a été montré que l'internalisation des complexes immuns circulants dans le compartiment endosomal était favorisée par le BCR [157,163]. L'activation par exemple de la voie TLR9 ainsi obtenue, favorise la prolifération des lymphocytes B et la production d'auto-anticorps supplémentaires.

Il est important de remarquer que certains de ces différents mécanismes, bien que non étudiés dans le contexte du Lupus Systémique, pourraient aussi stimuler les cellules NK et ainsi les faire intervenir dans l'immunopathologie du Lupus Systémique. En effet, les cellules NK expriment aussi les différents TLRs intracellulaires.

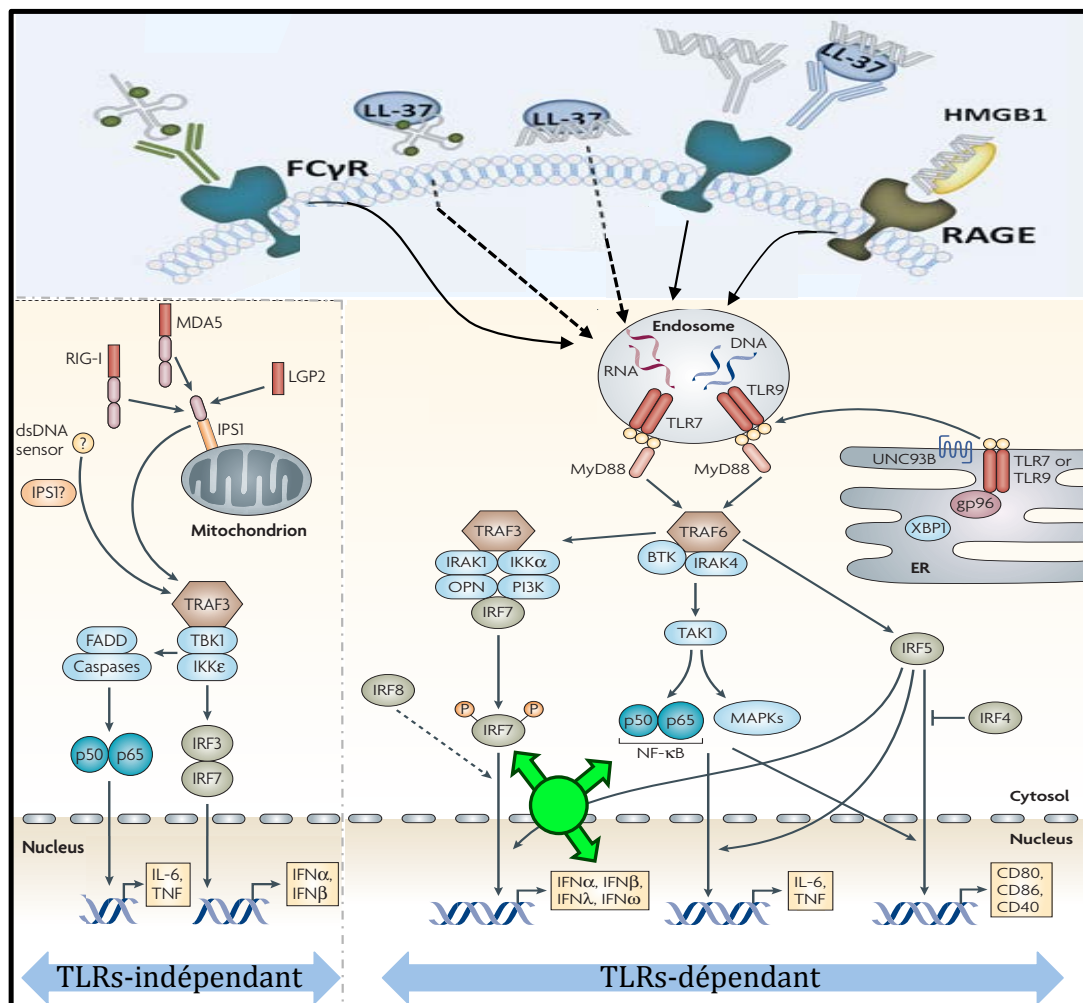


Figure 9 : Activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) par les acides nucléiques.

Schéma présentant les différentes voies de signalisation impliquant des « *pattern recognition receptors* » : RLRs, NLRs et TLRs. Pour les pDCs au cours du Lupus Systémique, la voie des TLRs est privilégiée et majoritairement liée à l'internalisation des complexes immuns circulants par les FcγRIIa. Cela aboutit à l'activation de différentes voies de signalisation, notamment via IRF7 et à la production massive d'IFNα.

2.2.4.4. Effets de l'IFN α et ses implications au cours du Lupus Systémique

L'IFN α est une glycoprotéine –dont il existe plusieurs sous-types- qui est très largement impliquée dans les réponses immunes innées et adaptatives. Cette cytokine joue un rôle primordial dans les défenses anti-virales, notamment par des mécanismes systémiques et locaux (paracrines). Il s'agit aussi de la cytokine clef de la physiopathologie du Lupus Systémique [55]: prescrite à visée thérapeutique, l'IFN α peut induire un Lupus Systémique ; l'IFN α est significativement augmentée dans le sérum des patients en phase active et de nombreuses cellules immunitaires portent la « signature » de cette cytokine [169], c'est à dire que la transcription de nombreux gènes inductibles par cette cytokine sont significativement « up-régulés » (*Figure 10*). Les effets cellulaires de l'IFN α sont multiples [170] et passent par la liaison au récepteur des IFN de type I (IFNAR1 & 2) puis à l'activation de la voie JAK1/Tyk2 qui induit la phosphorylation des facteurs de transcription STAT 1 & 2 [171]. On cite également les voies des PI3-kinases, MAP kinases ou bien encore de CRK (*Figure 10*). Les modes d'activation préférentielle de telles ou telles voies et leurs régulations sont mal connus. On sait toutefois, qu'ils sont plurifactoriels et font appel à plusieurs mécanismes redondants. Il est par ailleurs intéressant de remarquer que certaines de ces voies sont également utilisées pour la signalisation de TLR9 et de l'IFN γ .

Par ces nombreuses régulations géniques, l'IFN α assume des rôles anti-infectieux directs (synthèses de molécules antivirales comme l'adénosine déaminase des molécules pro-apoptotiques comme Fas/Fas-Ligand au sein des cellules infectées, ou encore l'inhibition du cycle cellulaire viral [172]. Notons que de tels effets pro-apoptotiques au cours du Lupus Systémique pourraient avoir un rôle délétère direct, en multipliant la production d'auto-antigènes.

De plus, chez l'Homme ou dans bien d'autres espèces comme la souris, l'IFN α stimule et coordonne l'activation du système immunitaire à différents niveaux :

- i) Au niveau de l'**immunité cellulaire innée** : l'IFN α induit la différenciation des monocytes en mDCs et leur maturation. Il induit ainsi la migration de ces cellules vers les ganglions ou les organes cibles et leur capacité à s'activer. Sur les monocytes, il induit l'expression de TLR7 [173] et sur les mDCs celle des molécules du CMH I et II (donc les capacités de présentation antigénique). Il favorise aussi l'expression de molécules de co- stimulation, comme le CD40 [158].

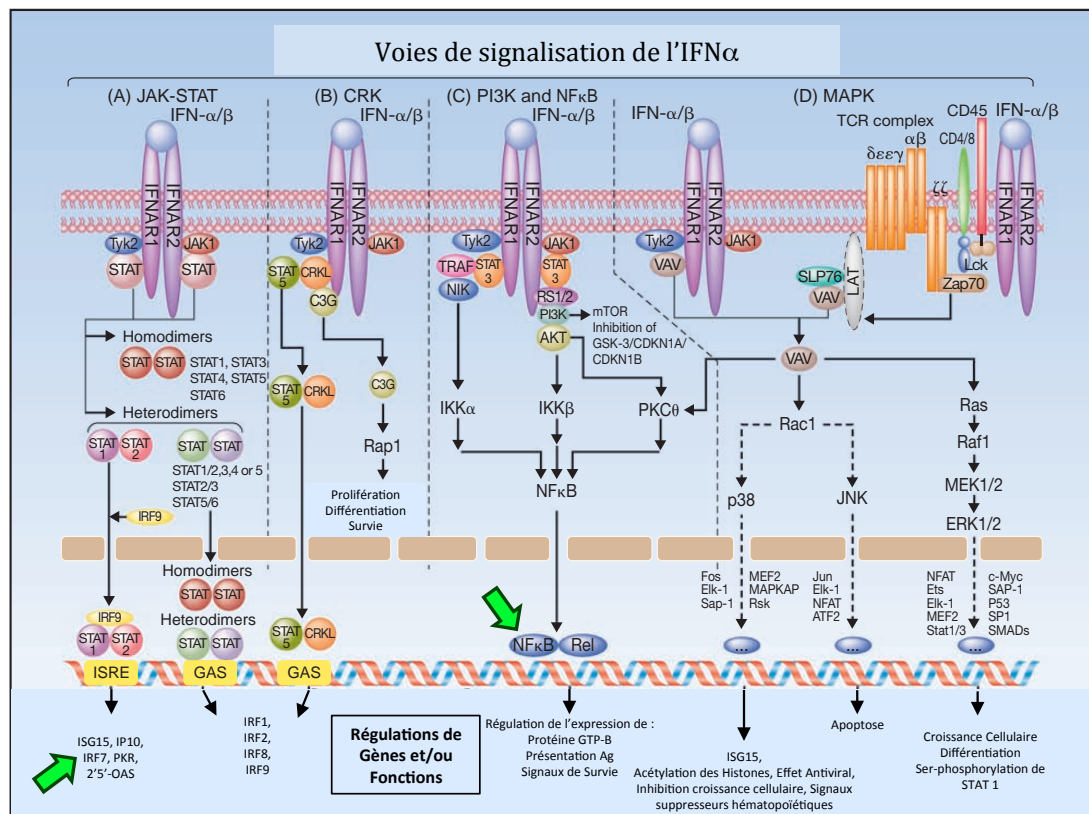


Figure 10 : Aperçu de la complexité des voies de signalisation de l'IFN α

A partir de sa liaison avec ses récepteurs IFNAR1 et 2, l'IFN α est en mesure d'activer les machineries cellulaires par 4 voies distinctes (JAK-STAT, CRK, PI3K-NF κ B et enfin MAPK). Ces différentes voies de signalisation aboutissent à l'activation de centaines de gènes ou directement à différentes fonctions (apoptose & cycle cellulaire notamment).

D'après Hervas-Stubs S, Clin Cancer Res, 2011.

Cela aboutit ensuite à l'activation des autres cellules immunitaires du système adaptatif, comme les lymphocytes T. L'IFN α a également un effet majeur sur les cellules NK puisqu'il augmente la cytotoxicité de ces cellules [54]. Son rôle sur la production de cytokines telles que l'IFN γ n'est par contre pas clairement démontré chez l'Homme.

- ii) L'IFN α active aussi directement des **mécanismes immunologiques adaptatifs** [55] : l'IFN α active les lymphocytes B (prolifération, commutation isotypique, abaissement du seuil d'activation et maturation en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines CD38+) [174]. L'IFN α permet aussi l'activation directe des lymphocytes T CD4⁺ et les oriente vers une réponse TH1 avec production d'IFN γ , et également l'activation des lymphocytes CD8⁺ (activation, différenciation et survie). Enfin L'IFN α inhiberait les lymphocytes T régulateurs [55].

Le rôle de l'IFN α au sein de l'immunopathologie du Lupus Systémique est primordial et pléiomorphe et n'épargne pas les cellules NK. Il n'agit pas de façon isolée mais avec d'autres chimiokines et cytokines, souvent élaborées sous sa propre influence par le système immunitaire inné ou adaptatif sont également impliqués [175]. C'est le cas par exemple de :

- i) **l'IL15, l'IL12 et l'IL18**, qui sont de puissants activateurs des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK et favorisent la production d'IFN γ par ces cellules.
- ii) **l'IFN γ** lui même, qui est produit par les lymphocytes T et les cellules NK, a de multiples actions immunologiques. Par exemple, il favorise aussi bien la présentation antigénique par les cellules spécialisées ainsi que le switch isotypique par les lymphocytes B [72].
- iii) **l'IL10 et l'IL6**, qui ont entre autres pour fonction de promouvoir la différenciation plasmocytaire [175].
- iv) **BLyS**, qui appartient à la famille des TNF et qui est produite par les monocytes/macrophages. BLyS est fortement impliquée dans l'immunopathologie du Lupus Systémique [176,177]. En effet, BLyS assure la survie et l'activation des lymphocytes B et des plasmocytes à différents stades de maturation et de différenciation.
- v) **l'IL17**, qui est produite par certains lymphocytes T CD4⁺ (TH17). Son activité pro-inflammatoire a récemment été démontrée au cours du Lupus Systémique[112].

Une telle présentation de l'immunopathologie du Lupus Systémique pourrait laisser sous-entendre que l'origine de la maladie soit seulement un problème lié à la mort cellulaire programmée et au défaut de clairance des produits de l'apoptose, qui ont à loisir de devenir immunogènes. L'activation globale du système immunitaire n'étant alors qu'une réaction « normale » à ces stimuli anormaux. Or, il semble que des anomalies propres au système immunitaire soient également mises en jeu. Pour mieux comprendre que la rupture de tolérance qui aboutit à l'expression clinique de la maladie doit être mise en rapport avec des anomalies immunologiques complexes, il est important de répertorier les bases génétiques qui ont été associées avec le Lupus Systémique. D'après des études de type « *Genome Wide Associated* », ces défauts pourraient concerner plus de 100 gènes [178,179].

2.2.4.5. Facteurs génétiques prédisposants au Lupus Systémique

De nombreux facteurs génétiques ont donc été impliqués dans la pathogénie du Lupus Systémique [123,138,180]. Ils concernent les différentes voies immunologiques mises en jeu et confirment donc l'implication de chacune d'entre elles.

Des causes monogéniques sont très rarement retrouvées. Ainsi, les familles où des cas de Lupus Systémiques surviennent par transmission mendélienne - comme celles présentant un déficit génétique en C1q (impliqué dans la clairance des corps apoptotiques) [149] ou en C4 (impliqué dans l'élimination des lymphocytes B auto-réactifs) [181]- sont exceptionnelles. Récemment, on a aussi décrit une mutation unique, dans le gène de la protéinase kinase C delta qui induit la survenue d'un Lupus Systémique, par hyperproduction d'IFN α par les pDCs [182].

Plus souvent, les anomalies génétiques constatées sont d'ordre polygénique. Il peut ainsi s'agir d'anomalie du nombre de copie de gènes, de polymorphismes de gènes ou de leurs promoteurs, ou même de dérégulations épigénétiques. On peut citer par exemple :

- i) Des altérations du nombre de gènes codant pour la fraction C4 du complément [183], pour les différents FcRs [184] ou pour TLR7. Ces anomalies affectent les phases précoces de l'activation du système immunitaire.
- ii) Même s'ils sont sujets à controverse, des polymorphismes de récepteurs au fragment FcRs [185-187], de TLR9 [188-190] ou de certains « *Interferon regulatory receptors* » qui interviennent dans les voies de production de l'IFN α ,

comme IRF5 ou IRF7 [191,192], ont été décrits : certains variants sensibilisent la réponse des cellules immunitaires aux différents stimuli initiateurs de la maladie. Des associations identiques ont été rapportées également pour des gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'IFN α comme STAT4 ou TYK2 [178,179].

De même, des variants portant sur les gènes de l'IL-10 (cytokine stimulant les lymphocytes B) ou encore de la chaîne zêta du CD3 exprimée par les lymphocytes T et impliquée dans leur activation ont été rapportés [195].

D'autre part, la fréquence de mutations de l'exonucléase TREX1 à l'état hétérozygote a également été constatée [196].

- iii) L'hypométhylation des régions promotrices de gènes, tels que des molécules de co-stimulation (CD40-ligand) ou PPP2CA (impliqué dans la voie de production d'IL2) a également été rapportée [123]. Ceci aboutit à la dérégulation de l'expression de ces différentes protéines impliquées elles aussi dans la pathogénie de la maladie.
- iv) D'autres dérégulations épigénétiques (comme la synthèse de micro-RNAs) responsables elles aussi de dérégulations de gènes impliquées dans les voies d'activation de l'IFN α ont également été étudiées récemment [195].

Les susceptibilités génétiques sont donc importantes et multiples au cours du Lupus Systémique. Toutefois elles ne sont qu'exceptionnellement de type mendélienne et n'expliquent pas à elle seules la survenue de la maladie. D'ailleurs, dans une famille présentant un cas index, le risque de survenue d'un autre cas de Lupus Systémique n'est que discrètement augmentée par rapport à la population générale et les taux de concordance entre jumeaux homozygotes ou dizygotes ne sont que de 25% et 2%, respectivement [118].

Ainsi, l'immunopathologie complexe du Lupus Systémique correspond à un large ensemble d'activations cellulaires successives et intriquées. Le rôle des cellules NK dans cet échiquier reste mal déterminé. Pourtant, les modes d'activation des cellules NK (notamment par l'intermédiaire des TLRs intracellulaires qu'elles expriment ou via l'IFN α) leur permettent théoriquement d'être impliqués en première ligne via des interactions directes avec certains auto-antigènes, et ceci dès les phases initiales de la maladie. De plus, leurs interactions avec de nombreux types cellulaires participant à

l'immunopathologie du Lupus Systémique permettent également d'envisager leur participation dans l'activation générale du système immunitaire adaptatif.

2.3. Myopathies inflammatoires

Les myopathies inflammatoires (ou myosites) représentent un ensemble hétérogène de maladies, très souvent auto-immunes, caractérisées au minimum par une inflammation et une nécrose musculaire pouvant aboutir à un déficit musculaire plus ou moins sévère. Leur prévalence est rare, avoisinant 10 cas pour 100 000 d'après les rares études épidémiologiques disponibles [197]. Par ailleurs, les myosites de l'adulte surviennent majoritairement entre les 4^e et 6^e décades.

2.3.1. Classification des différentes myopathies inflammatoires

A partir des descriptions initiales, on a distingué sur des bases cliniques et histologiques, les polymyosites et les dermatomyosites [198]. Si les premières sont limitées aux muscles striés, les secondes associent volontiers une atteinte dermatologique spécifique (Œdème Lilacé des paupières, Papulose de Gottron, Signe de la manucure etc...). Ces deux entités ont été largement caractérisées au plan histopathologique puis immunohistochimique [199]. De façon un peu schématique, la dermatomyosite s'apparente à une vascularite des capillaires des muscles et du derme, caractérisée par une réaction auto-immune à médiation humorale prédominante (infiltrat lymphocytaire périvasculaire B et T CD4+, présence périvasculaire du complexe d'attaque du complément : C5b9). La destruction musculaire est essentiellement liée à l'ischémie générée par ces lésions vasculaires et prédomine dans les zones périphériques des faisceaux musculaires (pérимysium), les moins oxygénées [199]. La polymyosite quant à elle est une pathologie à médiation surtout cellulaire, caractérisée par une infiltration de type lymphocytaire T CD8+. Celle-ci est majoritairement localisée plus en profondeur dans le tissu musculaire : au niveau de l'endomysium, directement au contact des fibres musculaires. Les myocytes surexpriment les molécules HLA-I et sont directement lysées par les cellules T CD8+ cytotoxiques [200,201].

Si ces considérations physiopathologiques permettent de différencier clairement ces deux entités : polymyosites et dermatomyosites, elles ne doivent masquer en réalité des mécanismes plus complexes, très intriqués et mettant en jeu plus largement tout le système immunitaire [201]. Ainsi, de façon similaire à ce qui est décrit au cours du Lupus Systémique, on observe un rôle pro-inflammatoire majeur des cellules du système immunitaire inné [201–203] et de certaines cytokines produites par ces types cellulaires, comme par exemple l'IFN α [204].

Toutefois, la dichotomie entre polymyosite et dermatomyosite est aujourd'hui un peu désuète et la classification des myosites a été revue sur la base de récentes caractérisations immunologiques et histologiques [199,205]. Les auto-anticorps spécifiques des myosites notamment (*Figure 11*), définissent aujourd'hui des entités assez spécifiques entre elles [206]. On distingue ainsi quatre groupes de myopathies « inflammatoires ».

- i) **Les polymyosites**, depuis l'entrée en vigueur de la classification de 2004 [205], sont nettement moins représentées. Aucun anticorps spécifique ne leur correspondent.
- ii) **Les dermatomyosites** restent une entité propre et sont associées à différents auto-anticorps (anti-Mi2 : appartenant à un complexe « remodeling-deacetylase nucléosomique », anti-MDA5 : « melanoma differentiation-associated gene 5 » etc...) [207,208]. Les principaux enjeux au cours des dermatomyosites restent le diagnostic et la prise en charge des cancers qui leur sont associés. Cette association n'est pas fortuite et concerne tout type de néoplasie. Ainsi, le risque de survenue d'un cancer concomitant (c'est à dire à +/- 3 ans du diagnostic) est multiplié par 4 dans ce contexte, voire même par 27, en cas de positivité de certains auto-anticorps, dont les anti-TIF-1 γ (« *transcriptional intermediary factor 1- γ* »), une ubiquitine ligase intervenant dans la voie du TGF β [209].
- iii) **Les myosites de chevauchement** sont les plus fréquentes et représentent environ un tiers de l'ensemble des myopathies inflammatoires. Leur spectre clinique dépasse la simple atteinte musculaire. En effet il comporte des atteintes qui sont « partagées » avec d'autres maladies auto-immunes (Sclérodémie Systémique, Syndrome de Gougerot-Sjögren, voire même Lupus Systémique). A ces myosites correspondent probablement une entité histologique propre [210] mais également une immunopathologie spécifique. Les principales myosites de

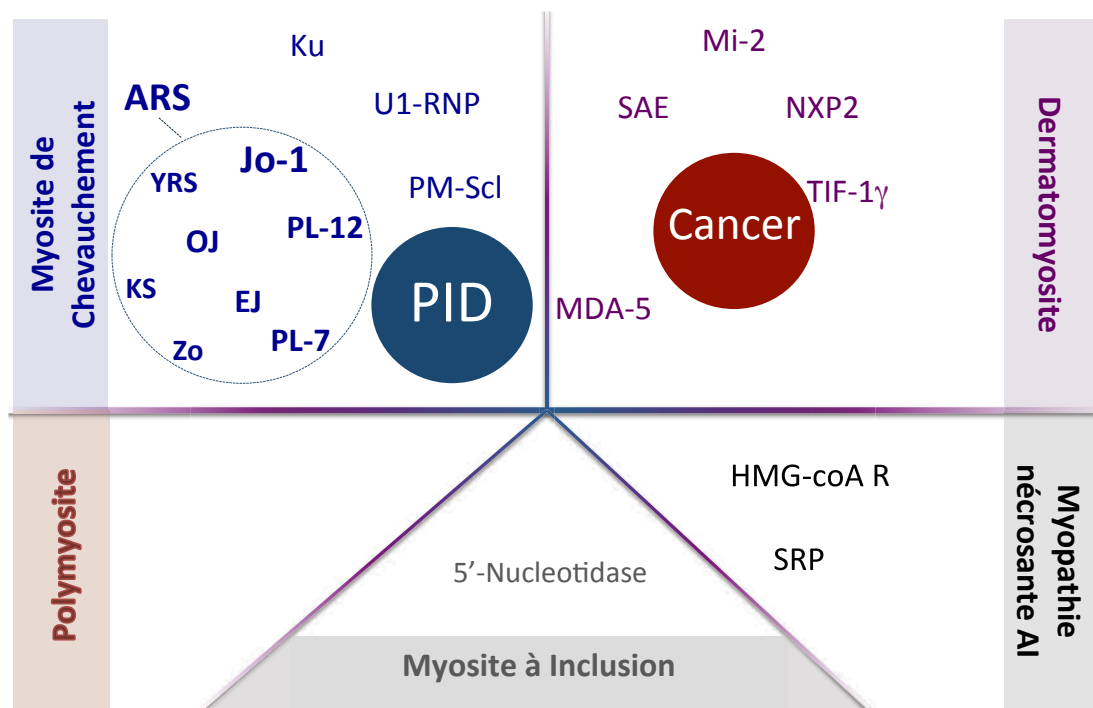


Figure 11 : Classification des Myopathies inflammatoires tenant compte des caractéristiques histologiques et la caractérisation des différents auto-anticorps spécifiques.

La myosite à inclusion n'est habituellement pas classée comme myopathie inflammatoire, mais la découverte récente d'auto-anticorps chez un tiers des patients incite à la placer dans cette classification. PID : Pneumopathie Infiltrante Diffuse ; ARS : anticorps anti-ANRt-Synthétases ; AI : Auto-immune.

chevauchement sont représentées par le Syndrome des Antisynthétases, qui est associé à 8 auto-anticorps différents, tous dirigés contre une ARNt-synthétase spécifique (*Figure 11*). L'enjeu pronostique majeur des myosites de chevauchement est la survenue très fréquente d'une pneumopathie infiltrante diffuse, dont le risque est l'évolution vers la fibrose pulmonaire et donc l'insuffisance respiratoire. En revanche, l'association avec les cancers (bien qu'encore controversée) n'est pas significative [211].

- iv) Récemment, le groupe des **myopathies nécrosantes auto-immunes** a été individualisé [212]. Ces dernières sont caractérisées au plan histologique par la survenue d'une nécrose musculaire parfois intense et l'absence ou la quasi-absence d'infiltrat inflammatoire (lymphocytaire) musculaire. Deux auto-anticorps leur sont actuellement associés : les anti-signal recognition particle (SRP) [213] et les anti-HMG-coenzyme-A réductase, souvent favorisés par la prise de Statines [214].

On décrit également, en marge des myopathies inflammatoires, une entité spécifique : **la myosite à inclusion**. Du fait de caractéristiques cliniques et histologiques propres et d'une insensibilité aux traitements immunomodulateurs, l'appartenance de la myosite à inclusion au groupe des myosites inflammatoires n'est pas classique. Toutefois, on a récemment décrit la présence d'auto-anticorps spécifiques (dirigés contre une 5'-nucléotidase cytosolique), chez un tiers des patients environ [215,216].

2.3.2. Syndrome des Antisynthétases

2.3.2.1. Définitions

Bien qu'il n'y ait pas à ce jour de critères internationaux de classification validés pour le Syndrome des Antisynthétases, il est admis depuis les descriptions initiales [217,218] qu'il associe essentiellement une myosite avec une pneumopathie infiltrante diffuse (dont il existe plusieurs types) et qu'il a pour marqueur sérologique la présence d'auto-anticorps anti-ARNt synthétases (*Annexe 4*). Théoriquement 21 auto-anticorps sont envisageables, puisqu'il existe 21 enzymes catalysant spécifiquement l'attachement d'acides aminés avec l'ARN de transfert qui leur correspond. Seulement 8

d'entre eux ont cependant été identifiés à ce jour. Le principal est l'anticorps anti-Jo1, présent chez environ 60% des patients présentant un Syndrome des Antisynthétases. Ces auto-anticorps sont mutuellement exclusifs entre eux (*Annexe 4*).

En fréquence variable, le Syndrome des Antisynthétases comporte également d'autres symptômes cliniques tels que des atteintes microvasculaires (phénomène de Raynaud), rhumatologiques (polyarthrite non déformante) ou dermatologiques (Mains de Mécaniciens). De plus, il n'est pas rare que les patients atteints de ce syndrome présentent des signes communs à d'autres maladies auto-immunes systémiques comme une sclérodactylie, empruntée à la Sclérodermie Systémique ou un syndrome sec emprunté au Syndrome de Gougerot-Sjögren etc...[211]. Outre les particularités de son spectre clinique, le Syndrome des Antisynthétases est caractérisé par une évolution chronique, capricieuse et relativement imprévisible (*Annexe 4*). Malgré les traitements, les rechutes sont fréquentes et sont susceptibles d'engendrer des séquelles parfois majeures, s'étendant au delà de la seule l'atteinte musculaire. C'est le cas notamment de l'atteinte pulmonaire qui altère sévèrement la qualité de vie des patients.

2.3.2.2. Mécanismes immunopathologiques

Du point de vue immunopathologique, le Syndrome des Antisynthétases est assez peu caractérisé. Néanmoins, il est intéressant de remarquer qu'on décrit non seulement des prédispositions et des mécanismes spécifiques mais également des éléments physiopathologiques partagés avec les maladies systémiques avec lesquelles ce syndrome chevauche. Actuellement, il existe un certain nombre d'arguments suggérant que la maladie est initiée au niveau pulmonaire : il existe une prédisposition HLA-DRB1*03 spécifiquement chez des patients fumeurs [219]. De plus, il a été démontré que la protéine antigénique histidyl-ARNt synthétase, contre laquelle sont dirigés les auto-anticorps anti-Jo1 est exprimée dans le tissu pulmonaire, dans une conformation particulière [220]. Sous l'action d'enzymes protéolytiques, comme Granzyme B, qui est notamment exprimée par les cellules NK, cette protéine peut-être clivée et devenir immunogène. En effet, les peptides générés agissent comme des chimio-attractants pour les lymphocytes T et les cellules dendritiques [221]. De plus, ils peuvent induire *in vitro* ou dans un modèle murin [222] l'activation du système immunitaire inné et adaptatif, via les voies d'activation dépendantes de TLR4 et TLR2 [223]. Ceci aboutit à la production des auto-anticorps par les lymphocytes B comme cela a été décrit pour le Lupus Systémique. Les lymphocytes B sont probablement co-stimulés par l'IFN α

produit [224] et maintenus via BlyS [225]: en effet ces molécules sont significativement augmentées, tout particulièrement dans ces formes de myosites de chevauchement. Le rôle pathogène des auto-anticorps est par contre moins clair, notamment au niveau musculaire. Du point de vue qualitatif, l'existence de différences phénotypiques selon la spécificité des auto-anticorps antisynthétases plaide pour un rôle pathogène de ces derniers, à moins que cela ne soit lié au terrain immunogénétique [226]. Du point de vue quantitatif, une seule étude a montré un lien entre les taux d'anticorps et l'activité de la maladie [227].

La place des cellules NK dans la physiopathologie du Syndrome des Antisynthétases n'est pas décrite.

2.4 Traitement médical des maladies auto-immunes systémiques

Le traitement médical du Lupus Systémique comme celui des myosites comporte des traitements immunomodulateurs, qui sont adaptés à la sévérité de la maladie et remplissent deux rôles majeurs : éteindre les poussées puis prévenir leurs récurrences. Parmi ceux-ci on distingue donc :

- i) Les **immunomodulateurs** puissants qui sont utilisés lors des poussées. Il s'agit des corticoïdes à forte dose et par voie générale, dont l'efficacité est rapide, ou encore les immunosuppresseurs « classiques » comme le cyclophosphamide ou le mycophénolate mophétil par exemple, qui sont proposés en cas d'atteintes viscérales sévères [228,229].
- ii) Les **corticoïdes** à faible dose sont utilisés comme traitement de fond et sont aussi associés à des traitements immunosuppresseurs, s'ils ont été nécessaires à la mise en rémission (comme le mycophénolate mophétil, le méthotrexate ou l'azathioprine) [230]. Les mécanismes d'action de ces immunomodulateurs sont multiples et assez peu spécifiques : ils ciblent donc les cellules immunitaires dans leur ensemble.

Au cours du Lupus Systémique, un immunomodulateur modeste mais très utile est proposé comme traitement de fond : il s'agit de l'**hydroxychloroquine**, dont le délai d'action est long, mais dont on a montré tout l'intérêt en prévention des récurrences [231]. L'hydroxychloroquine est un antipaludéen de synthèse dont le mode d'action passe par l'inhibition de l'acidification des vésicules lysosomales

[232], c'est à dire par l'inhibition de certaines réactions métaboliques, comme la fixation des TLRs intracellulaires avec leurs ligands [233].

- iii) Les **biothérapies** sont des thérapies innovantes et ciblées sur des mécanismes précis dont l'implication dans la pathogénie de la maladie est clairement démontrée [234]. Leur utilisation au cours des maladies auto-immunes répond à plusieurs objectifs : diminuer les effets secondaires des traitements « classiques » ou améliorer la condition de patients réfractaires aux autres traitements. En effet, du fait d'effets secondaires non négligeables dans le contexte (comme la myopathie cortisonnée), d'une cortico-dépendance fréquente ou de la survenue malgré tout de rechutes, l'utilisation des corticoïdes tend à être de plus en plus limitée (en dose et en durée). Or, ceci ne peut se faire que grâce à l'adjonction d'autres traitements immunomodulateurs, prescrits à visée d'épargne cortisonnée [235]. Et dans ce cadre précis, la prescription de biothérapies tend à être de plus en plus large. Néanmoins, ces nouveaux traitements -souvent coûteux- ne sont pas eux non plus dénués d'effets secondaires. De plus, pour un patient donné, leur efficacité n'est pas, *a priori* évaluable. Néanmoins, la place des biothérapies dans la stratégie globale de prise en charge d'un patient atteint de Lupus Systémique ou même de myopathie inflammatoire n'est pas toujours très clairement définie, mais leur bénéfice a été montré dans certains contextes particuliers. Ces nouvelles approches sont donc souvent proposées « au cas par cas » c'est à dire dans le cadre d'une médecine de plus en plus personnalisée.

Les principales biothérapies utilisées sont les anticorps monoclonaux anti-CD20 [236,237] et les anti-BLyS qui ciblent les lymphocytes B, producteurs des auto-anticorps pathogènes [238,239]. De nombreuses autres biothérapies sont en développement (plus ou moins avancé) et ciblent par exemple des molécules de co-stimulation (CTLA4-Ig) [240], des cytokines comme l'IFN α [241–243], l'IFN γ ou certaines voies d'activation spécifiques comme les TLRs, impliqués dans la physiopathologie du Lupus Systémique [244].

Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques du Lupus Systémique et des myopathies inflammatoires (et tout particulièrement du Syndrome des Antisynthétases) pourrait permettre une prise en charge médicale plus personnalisée : il s'agit grâce à différents marqueurs immunologiques, de mieux évaluer et de mieux prédire le potentiel évolutif de la maladie mais également la réponse à des traitements spécifiques. De plus, des connaissances physiopathologiques complémentaires pourraient aider au développement de nouvelles biothérapies ciblant de nouveaux axes immunologiques.

3. Implication des cellules NK au cours des maladies auto-immunes

Le rôle des cellules NK au cours des maladies auto-immunes a été peu étudié jusqu'à présent. Il a été montré, tant en pathologie humaine que dans des modèles animaux, tantôt un rôle protecteur et tantôt un rôle délétère [245]. Beaucoup de paramètres –qui sont abordés ci-après- sont susceptibles d'expliquer ces différences : la physiopathologie des maladies auto-immunes est hétérogène et les fonctions des cellules NK sont multiples. Notamment, les interactions des cellules NK avec les autres cellules immunitaires impliquées dans les réactions auto-immunes semblent jouer un rôle essentiel.

3.1. Modèles animaux

Des données controversées ont été décrites concernant le rôle des cellules NK selon les différents modèles animaux étudiés. Par exemple, les cellules NK favorisent la myasthénie expérimentale auto-immune en phase précoce [246]. Selon les conditions, les cellules NK protègent de l'encéphalite auto-immune (forme murine de sclérose en plaque) mais peuvent aussi la favoriser [247–249]. Des résultats contradictoires ont également été observés dans les modèles de diabète auto-immun murin, où les cellules NK jouent un rôle tantôt protecteur [250], tantôt délétères, en infiltrant le tissu pancréatique [251,252]. Par ailleurs, dans les modèles murins classiques d'étude du Lupus Systémique (lpr) où le gène Fas est muté, la diminution progressive de la cytotoxicité des cellules NK avec le temps, corrèle avec l'aggravation de la maladie [253].

Ces résultats en apparence conflictuels peuvent toutefois être expliqués par l'existence d'un fond génétique différent selon les animaux étudiés, de système d'induction de la maladie variables (immunisation vs prédisposition génétique) ou encore des cinétiques d'intervention sur les cellules NK différentes. On peut également envisager que les cellules NK jouent un rôle de cellules effectrices et/ou immuno-régulatrices selon l'environnement tissulaire, cellulaire ou cytokinique dans lequel elles sont situées [245].

Bien que ces modèles animaux soient informatifs et permettent d'étudier l'effet des cellules NK au niveau de différents tissus cibles, les mécanismes mis en évidence sont difficilement extrapolables aux maladies auto-immunes humaines, notamment aux maladies auto-immunes systémiques.

3.2. Pathologie humaine

Du fait de son accessibilité aisée, les études portant sur les cellules NK au cours des maladies auto-immunes systémiques se sont focalisées pour la plupart sur le compartiment sanguin. Cependant, ce compartiment ne reflète que partiellement les réactions immunologiques qui peuvent se tenir dans les organes lymphoïdes ou dans les tissus cibles de ces maladies. De plus, la majorité de ces études étant uniquement descriptives, elles ne permettent qu'une interprétation partielle du rôle des cellules NK dans le contexte d'auto-immunité. Toutefois, un recensement large des données de la littérature est indispensable pour envisager le rôle possible des cellules NK (eu égard à leurs différentes fonctions) au cours de chacune de ces maladies complexes, notamment le Lupus Systémique (*Table 3*).

3.2.1 Anomalies constatées

Dans le compartiment périphérique, un défaut quantitatif des cellules NK « circulantes » est connu de longue date, notamment au cours du Lupus Systémique (*Table 3*). Ces anomalies quantitatives ont été rapportées au cours de la plupart des maladies auto-immunes systémiques (exception faite de la polyarthrite rhumatoïde) et ceci avant même la distinction entre les cellules NK et les cellules NKT (ce qui rend difficile l'interprétation des études les plus anciennes) [254,255]. Ce déficit quantitatif n'est en général pas isolé. Il accompagne souvent une lymphopénie globale et semble relativement indépendant de l'effet de certains traitements immunomodulateurs indiqués au cours des maladies auto-immunes systémiques. Il est à noter cependant que certains des traitements pourraient *a minima* influencer sur la fonctionnalité des cellules NK [256,257]. Dans la plupart des maladies auto-immunes systémiques, il a été noté un déficit qualitatif des cellules NK, principalement mis en évidence par l'effondrement de la cytotoxicité NK [258–262]. Le plus souvent ce déficit concerne la

cytotoxicité naturelle mais parfois également l'ADCC. Cette diminution de cytotoxicité au cours du Lupus Systémique semblant discordante avec l'effet attendu de l'augmentation des taux d'IFN α sériques, il a été très tôt supposé qu'il existait un épuisement de l'effet de cette cytokine sur les cellules NK [261,262].

Il est à noter que ces anomalies sont constatées chez des patients en phase inactive mais qu'elles peuvent être plus marquées lorsque la maladie auto-immune est active. Toutefois, les études longitudinales étant très rares [263], il est difficile de savoir si ces défauts sont intrinsèques et constituent une prédisposition aux maladies auto-immunes systémiques et/ou si elles sont la conséquence de signaux extrinsèques aux cellules NK. On notera également que ces anomalies -bien que profondes- n'engendrent pas de sur-risque d'infections majeures ; elles ne constituent donc pas à proprement parler un déficit immunitaire.

Bien qu'alimentant de nombreuses hypothèses, peu de données formelles sont disponibles chez l'homme concernant les fonctions immunorégulatrices des cellules NK circulantes au cours des maladies auto-immunes systémiques, comme par exemple leur capacité à produire des cytokines particulières [259] ou à avoir des interactions avec d'autres types cellulaires présents dans le compartiment sanguin.

Par ailleurs, dans un contexte d'auto-immunité systémique, peu de travaux ont porté sur l'étude des cellules NK dans les tissus. Une étude au cours des myosites a permis de relativiser le rôle effecteur des NK dans le tissu cible que constitue le muscle, en montrant l'absence de localisation de cellules NK à ce niveau. Néanmoins, certains récepteurs (CD85j/ILT2) ou ligands (HLA-G) des cellules NK, qui sont également exprimés par d'autres types cellulaires, pourraient être impliqués [264,265]. Les études les plus approfondies portent sur la **polyarthrite rhumatoïde**, où l'accès au tissu cible articulaire est possible par prélèvement de liquide synovial. L'implication des cellules NK dans la pathogénie de cette maladie est donc mieux documentée. Comme attendu, les cellules NK du liquide synovial ont un phénotype particulier CD56^{bright}, différent des cellules NK circulantes [266,267]. De plus, dans ce tissu cible les cellules NK sont activées [268] et ont une grande capacité de production de cytokines, comme l'IFN γ et surtout le TNF α , qui favorisent la maladie. Dans ce cadre, les interactions des cellules NK avec l'environnement tissulaire semble importants [269,270].

3.2.2. Causes possibles

Certaines équipes ont recherché les causes des défauts quantitatifs et qualitatifs observés sur les cellules NK. Néanmoins, peu d'études dynamiques sont disponibles à ce jour pour expliquer l'origine de ces anomalies [262]. Il a été suggéré mais non formellement démontré, qu'au cours du Lupus Systémique des facteurs sériques sont associés avec la diminution d'activité des cellules NK. Des corrélations statistiques et des effets immunologiques directs (cultures cellulaires en présence de *sera* de patients) suggèrent que l'IFN α , plutôt que des auto-anticorps (sous formes de complexes immuns circulants) pourrait jouer un rôle majeur [262].

Très peu études phénotypiques extensives, visant à analyser la proportion des différents récepteurs à la surface des cellules NK ont été réalisées [271] (*Table 3*). Il est ainsi difficile d'envisager par ce biais l'implication spécifique de certains récepteurs. Par contre, certains ont recherché des prédispositions génétiques qui puissent expliquer les défauts qualitatifs de ces cellules NK. Ainsi, différentes anomalies génétiques ont été mises en évidence. Elles sont d'ordre génotypique, allélique ou liées à des polymorphismes. Elles concernent différents récepteurs et voies de signalisation impliqués dans des voies d'activation particulières des cellules NK : reconnaissances de type « *missing self recognition* », ADCC et « *stress-induced recognition* » :

- i) Ainsi, les principales études ont porté sur les associations **KIRs/HLA-I**, c'est à dire sur une influence potentielle du «licensing» et de l'activation de la cytotoxicité des cellules NK de type « *missing self recognition* » au cours des maladies auto-immunes [272]. Ceci fut mis en évidence pour certaines maladies auto-immunes spécifiques d'organe ou de rhumatismes inflammatoires non auto-immuns [273], qui ne seront pas développés dans ce travail, mais également au cours de certaines maladies auto-immunes systémiques (Sclérodermie Systémique, Lupus Systémique etc...[20,21,274,275]). Il est important de remarquer que dans la plupart des cas, ce sont des récepteurs activateurs qui sont impliqués. Théoriquement, toutes ces anomalies diminuent le « tonus inhibiteur » prépondérant des cellules NK. Ceci contraste donc avec la diminution des activités cytotoxiques décrites pour les cellules NK circulantes, et souligne donc l'importance d'étudier les fonctions des cellules NK circulantes de façon dynamique (stimulation de récepteurs spécifiques) et également les cellules NK dans les tissus cibles.

Table 3 : Lupus Systémique : récapitulatif des données de la littérature concernant la description d'anomalies des cellules NK (1989-2014).

* : intrafamilial ; ° : Stimulation PMA +Ionomycine. N= nombre ; LS : Lupus Systémique

Publications			n LS	Quantitatif Nombre NK/ % NK	Fonctions Cytolyse/ Production cytokines	Anomalies Phénotypiques		Association avec		Remarques
1er auteur	Journal	Année				Diminution	Augmentation	Activité	Clinique	
Toth J	<i>Immunobiol</i>	1989	5*		Diminuée			Non		
Struyf NJ	<i>ARD</i>	1990	14		Diminuée	CD16+				
Markeljevic J	<i>J Clin Lab Immunol</i>	1991	17	Diminué	Diminuée					
Yabuhara A	<i>J Rheum</i>	1996	25	Diminué	Diminuée			Oui		Cas pédiatriques, Suivi longitudinal
Erkeller-Yuksel FM	<i>Lupus</i>	1997	20	Diminué/ Diminué				Oui	Oui (LN)	Longitudinal: pas de différence
Ricciari V	<i>Lupus</i>	2000	58	Diminué/ Diminué						
Wouters CHP	<i>B J Dermatol</i>	2004	48	Diminué	Diminuée				LES > LC	
Toyabe S	<i>J Autoimmunity</i>	2004	12			DAP12 (protéine & ARNm)				ARNm: mutations, ADN: normal
Green MR	<i>Clin Exp Immunol</i>	2005	64*	Diminué	Diminuée			Oui		Diminution activité chez certains relatifs
Schepis D	<i>Immunology</i>	2008	33				CD56 ^{bright} & NKp46		Non	
Schleinitz N	<i>PLoS ONE</i>	2009	13			CD16 (MFI) & CD244	CD158b/j (MFI)			Expression DAP12 : normale
Puxeddu I	<i>Scand J Rheumatol</i>	2012	14	nd / Diminué		NKG2D, DNAM-1, NTB-A & 2B4		Non		
Henriques A	<i>Clin Rheumatol</i>	2013	44	Diminué/ Diminué	nd /Low TNFα , High IFNγ°	CXCR3, Granzyme (MFI)		Oui	nd	
Ye Z	<i>Int J Rheumatic dis</i>	2014	32	nd / Diminué	Normale/ Normal IFNγ°	KIR3DL1-3 & NKG2C	NKp46			

- ii) D'autre part, des polymorphismes spécifiques, concernant le **CD16/FcγRIIIA**, ont été recherchés chez des patients atteints de Lupus Systémique. Etant en effet impliqué dans la clairance des complexes immuns circulants, le CD16/FcγRIIIA était un candidat intéressant à étudier dans cette pathologie. Ainsi, certains polymorphismes qui prédisposeraient au Lupus Systémique pourraient conditionner certaines formes cliniques et/ou certains modes évolutifs [185,186]. En résumé, une modulation de l'affinité du récepteur FcγRIIIA pour ses ligands – des complexes immuns circulants- pourrait agir sur l'activité d'ADCC exercée par les cellules NK vis-à-vis de cellules cibles.
- iii) Enfin, très récemment et pour la première fois dans le cadre des maladies auto-immunes, il a été rapporté qu'une susceptibilité génétique portant sur un nucléotide particulier du promoteur d'un récepteur activateur des cellules NK : **NCR3/NKp30** pourrait protéger contre la survenue du Syndrome de Gougerot-Sjögren [276]. Il a par ailleurs été montré que l'interaction de ce récepteur avec son ligand, B7-H6, exprimé par les cellules cibles était directement impliqué dans la physiopathologie de cette maladie auto-immune, impliquant donc une reconnaissance de type « *stress recognition* ».

3.2.3 Conséquences possibles

Les conséquences des anomalies des cellules NK constatées au cours des maladies auto-immunes systémiques sont difficiles à envisager, notamment du fait que les fonctions de ces cellules dans les tissus n'ont pas toujours été étudiées. Par analogie avec le diabète de type 1, l'hypothèse de cellules NK à fort potentiel effecteur, c'est à dire génératrices de lésions dans les tissus cibles, a été suggérée mais n'est pas démontrée [273]. Par contre, l'exemple de la polyarthrite rhumatoïde permet d'envisager un rôle immunorégulateur des cellules NK au cours des maladies auto-immunes, notamment par la production de certaines cytokines clefs ou via des interactions avec d'autres cellules immunitaires. Par exemple, l'interaction des cellules NK avec les monocytes favorise l'évolution de la maladie, c'est à dire la destruction articulaire [270,277]. Des interactions avec d'autres cellules immunitaires innées ou adaptatives (Macrophages, Lymphocytes T ou B...) ont été proposées, par analogie avec des études réalisées *in vitro* à partir de sujets sains ou au cours de pathologies

infectieuses ou tumorales [278–281], mais ne sont pas formellement démontrées dans un contexte auto-immun.

Il est important de noter, qu’au moment où a débuté ce travail de Thèse en 2011, seules quelques données parcellaires étaient disponibles sur le rôle des cellules NK au cours du Lupus Systémique (*Table 3*) ou des Myosites. Ces données préliminaires témoignaient d’un possible rôle des NK au cours des maladies auto-immune systémiques qui méritait le développement d’études plus approfondies.

II. Objectifs

Ce travail a été initié suite à l'observation dans le laboratoire du cas d'un patient présentant une lymphoprolifération indolente de phénotype NK compliquée d'une myasthénie auto-immune [282].

Il s'agissait initialement de montrer l'implication de ces cellules de l'immunité innée dans la survenue des maladies auto-immunes en général, en postulant *a priori* que des cellules NK anormales pouvaient favoriser la survenue de ce type de maladies.

Après avoir rapidement testé plusieurs maladies auto-immunes, différentes données phénotypiques et fonctionnelles ont indiqué que les cellules NK circulantes pouvaient être impliquées dans deux d'entre-elles en particulier: le Lupus Systémique et les Myopathies Inflammatoires.

Afin de déterminer les mécanismes pouvant être impliqués dans cette dérégulation des cellules NK au cours de certaines maladies auto-immunes, un travail plus analytique a ensuite été réalisé, en étudiant l'effet de différents stimuli sur les fonctions des cellules NK et en caractérisant les cellules NK dans les tissus. Il s'agissait de caractériser les facteurs impliqués dans les anomalies observées, et d'en déterminer les conséquences.

III. Résultats

1. Etude descriptive des cellules NK circulantes au cours du Lupus Systémique

1.1 Introduction

Le premier travail au cours de cette thèse a consisté en une étude extensive phénotypique et fonctionnelle des cellules NK chez des patients atteints de Lupus Systémique. Ces travaux ont été rendus possibles grâce aux récents progrès concernant la description des récepteurs des cellules NK (panel étudié : 17 marqueurs de surface) et l'utilisation de cytométrie en flux à multi-paramètres. Ceci a permis d'une part de caractériser très précisément leur phénotype et d'autre part d'évaluer leurs capacités cytotoxiques (naturelle et par ADCC) et leurs capacités de production intra-cellulaire d'IFN γ .

L'objectif principal de cette étude était de corrélérer les caractéristiques des cellules NK observées avec l'activité de la maladie, ce qui n'avait pas été précisément étudié jusqu'alors.

Phenotype and Function of Natural Killer Cells in Systemic Lupus Erythematosus

Excess Interferon- γ Production in Patients With Active Disease

Baptiste Hervier,¹ Vivien Beziat,² Julien Haroche,³ Alexis Mathian,¹
Pierre Lebon,⁴ Pascale Ghillani-Dalbin,³ Lucile Musset,³ Patrice Debré,²
Zahir Amoura,¹ and Vincent Vieillard²

Objective. To determine the phenotype and the functionality of natural killer (NK) cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE).

Methods. A total of 94 patients with SLE (91 women and 3 men) were compared with 26 healthy controls. Active SLE was defined by an SLE Disease Activity Index score ≥ 4 . Immunologic tests were performed using nonactivated and/or interleukin-2 (IL-2)-activated peripheral blood mononuclear cells. NK cell phenotype was determined by flow cytometry. NK cell natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) were determined by ^{51}Cr release and CD107a degranulation experiments. Intracellular interferon- γ (IFN γ) production by NK cells was evaluated after overnight stimulation with IL-12 and IL-18. IFN α levels were assessed using an antiviral cytopathic bioassay.

Results. The absolute NK cell count was decreased in patients with active SLE, but the relative frequencies of total CD3-CD56^{bright} NK cells and CD3-CD56^{dim} NK cells were unaffected. The

CD3-CD56^{dim} NK cells in patients with active SLE displayed unique phenotypic characteristics, including significant increases in CD69 and NKG2A and decreased expression of Fc γ receptor type IIIa/CD16, CD8 α , and the killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) KIR2DL1/KIR2DS1. Concomitant with these findings, NK cells from SLE patients had lower cytotoxicity but a normal level of ADCC compared with NK cells from healthy controls. There was a significant positive correlation between the increased level of IFN α in the serum and the enhanced frequency of IFN γ + cells in patients with active SLE ($r = 0.370$, $P = 0.04$).

Conclusion. NK cells in patients with active SLE display phenotypic and functional features associated with activation. Furthermore, NK cells from patients with active SLE have the capacity to produce large amounts of IFN γ . This could contribute to the dysregulation of the link between innate and adaptive immunity seen in SLE.

Natural killer (NK) cells provide the first line of defense against infections and developing malignancies. They are a heterogeneous subset of cells that differ in their proliferative potential, homing characteristics, functional capacities, and responses to different cytokines. They can be divided into 2 major subsets, based on the relative densities of CD56 surface expression. Peripheral blood NK cells comprise $\sim 10\%$ CD56^{bright} and $\sim 90\%$ CD56^{dim} NK cell subsets, which are relatively distinct upon activation (1). CD56^{bright} NK cells proliferate and produce a wide range of cytokines (e.g., interferon- γ [IFN γ], tumor necrosis factor β , and interleukin-10 [IL-10]) and chemokines (e.g., macrophage inflammatory protein 1 α and RANTES) but display minimal cytotoxic activity, while CD56^{dim} NK

¹Baptiste Hervier, MD, Alexis Mathian, MD, PhD, Zahir Amoura, MD, PhD: Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, and INSERM, UMR-S 945, University of Paris 6, Paris, France; ²Vivien Beziat, PhD, Patrice Debré, MD, PhD, Vincent Vieillard, PhD: INSERM, UMR-S 945, University of Paris 6, Paris, France; ³Julien Haroche, MD, PhD, Pascale Ghillani-Dalbin, PhD, Lucile Musset, PhD: Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁴Pierre Lebon, PhD: Saint Vincent de Paul Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France.

Address correspondence to Baptiste Hervier, MD, French Referral Center for Lupus and Autoimmune Diseases, Service de Médecine Interne 2, Hôpital Pitié Salpêtrière, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France. E-mail: baptiste.hervier@psl.aphp.fr.

Submitted for publication July 7, 2010; accepted in revised form February 16, 2011.

cells show little proliferation, produce relatively lower amounts of cytokines, and are highly cytotoxic.

As our understanding of NK cell biology has improved, it has become clear that NK cell responses are dictated by the balance between inhibitory and activating signals originating from cell surface receptors. Under normal circumstances of immune self-surveillance, NK cells have inhibitory receptors that recognize class I major histocompatibility complex (MHC) molecules as their cognate ligands; these receptors include killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs), Immunoglobulin-like transcript 2 (ILT-2), and the CD94/NKG2A heterodimeric receptor. However, cytolysis does not occur simply as a result of the absence of class I MHC molecules, but also requires an activating receptor. Several such receptors have been characterized, including NKG2C, NKG2D, and the natural cytotoxicity receptors: NKp30, NKp44, NKp46, and NKp80 (2–5).

Systemic lupus erythematosus (SLE) is characterized by many immunologic abnormalities of the immune cell subsets. Even though the adaptive immune mechanisms (6–8) that lead to organ impairment in SLE are now better understood, the role of other innate immune cells, including NK cells, remains poorly studied.

Investigators in previous studies have reported fewer NK cells (9,10) and decreased cytotoxicity (10–12) in SLE patients. It was hypothesized that IFN α could suppress NK cell cytotoxicity (13,14). Park et al (15) recently suggested that impaired NK cell differentiation in SLE could contribute to immune system dysregulation. However, a tight relationship between NK cell abnormalities and SLE activity was not clearly established and remains controversial (10,12).

The aim of this study was to phenotypically and functionally characterize NK cells in patients with active SLE and those with inactive SLE. We investigated the relative proportions of different NK cell types and the

expression of NK cell receptors, and we studied the activity of NK cells in terms of their direct cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), and production of cytokines.

PATIENTS AND METHODS

Patients and controls. The patient characteristics are summarized in Table 1. The studied cohort included 94 patients from the French reference center for SLE at Pitié-Salpêtrière Hospital between January 2005 and November 2010. All patients were diagnosed as having SLE according to the revised American College of Rheumatology criteria (16). Disease activity was assessed using the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) (17), and a score ≥ 4 defined active disease. According to this cutoff value, 54 patients had inactive SLE (median SLEDAI score 2 [range 0–3]) and 40 had active SLE (median SLEDAI score 12 [range 4–44]). All but 5 patients received hydroxychloroquine (200 or 400 mg daily) and/or oral prednisone (<0.5 mg/kg daily). A total of 15 patients received a stable dosage of mycophenolate mofetil (2 gm daily) for at least 3 months. Twenty-six healthy blood donors from the Etablissement Français du Sang or from our institution served as controls. All patients provided informed consent, and this study was approved by the local ethics committee.

Flow cytometry. Five-color flow cytometric analysis was performed on freshly harvested blood cells. NK cells were analyzed after staining with appropriate antibodies to the following antigens: CD3, CD8 α , CD16, CD56, CD69, KIR2DL1/KIR2DS1, KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2, KIR3DL1/KIR3DS1, NKG2A, NKG2D, NKp44, NKp46, ILT-2, and 2B4 (all from Beckman Coulter), leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1 (LAIR-1; Becton Dickinson), NKG2C (R&D Systems), and NKp30 (Miltenyi Biotec). Fluorescence-activated cell sorting lysing solution (Becton Dickinson) was used to lyse erythrocytes. At least 20,000 leukocytes were analyzed on an FC500 instrument (Beckman Coulter).

NK cell degranulation, ADCC, and cytolytic assays. For functional assays, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from blood by centrifugation using Ficoll-Hypaque gradient. PBMCs were resuspended at 2×10^6 /ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, plus antibiotics and nonessential amino acids. Direct cytolytic activity of either nonactivated or

Table 1. Characteristics of the patients and controls*

	Controls (n = 26)	Patients with inactive disease (n = 54)	Patients with active disease (n = 40)
No. of women	22	52	39
Age, median (range) years	28 (21–63)	35 (18–69)	30 (18–63)
SLEDAI score, median (range)	–	2 (0–3)	12 (4–44)
No. of patients taking HCQ	–	50	28
Steroid dosage, median (range) mg/day	–	5 (0–35)	10 (0–35)
No. of patients taking MMF	–	6	9

* There were no significant differences between patients in either group and controls. SLEDAI = Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; HCQ = hydroxychloroquine; MMF = mycophenolate mofetil.

IL-2-activated (by 48-hour culture in the presence of 1,000 units/ml IL-2; Chiron) NK cells was assayed in a standard 4-hour ^{51}Cr -release assay against K562 target cells. ADCC experiments were performed using nonactivated PBMCs and Raji target cells in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-CD20 monoclonal antibody (mAb) (rituximab; Roche).

Degranulation experiments were performed as previously described (18). Briefly, 5×10^5 effector cells were mixed or not with target cells to a 1:1 ratio and incubated at 37°C and 5% CO_2 in the presence of anti-CD107a mAb (H4A3; Becton Dickinson) to monitor degranulation. After 1 hour of incubation, 2 mM monensin was added and cells were incubated for an additional 3 hours. Cells were thereafter stained for extracellular antigens with anti-CD3 and anti-CD56 antibodies and analyzed by flow cytometry. Degranulation experiments were performed using either nonactivated effector cells or IL-2-activated effector cells (following a 48-hour culture in the presence of 1,000 units/ml IL-2 before the tests).

Intracellular production of IFN γ . For intracellular staining of IFN γ , PBMCs were incubated overnight in the presence of IL-12 (10 ng/ml) and IL-18 (100 ng/ml) (R&D Systems). NK cells were stained with anti-CD3 and anti-CD56 at the cell surface level, fixed, permeabilized with the Cytofix/Cytoperm kit (Becton Dickinson), and then stained with anti-IFN γ mAb, as previously described (19).

IFN α functional assay. IFN α levels in SLE sera were measured using an antiviral cytopathic bioassay (20). This assay is based on the antiviral activity of human IFN α in Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells in the presence of vesicular stomatitis virus (VSV), Indiana strain (Pasteur Institute). Dilutions of SLE serum were added to 20,000 MDBK cells/well in minimal essential medium/10% fetal bovine serum. After incubation overnight at 37°C , plates were washed with phosphate buffered saline, and VSV (10 times the dose needed to kill 50% of the cells) was added to each well. After overnight incubation at 37°C , cell lysis was assessed microscopically. A laboratory reference of human IFN α , which had been standardized with the National Institutes of Health reference (Ga 023-902-530), was included with each titration. One unit of IFN α activity was defined as the reciprocal of the dilution that results in destruction of 50% of cells.

Statistical analysis. Intergroup comparisons were made using the Mann-Whitney U test. Correlations between numerical values were analyzed using Spearman's rank correlation test. Results were considered significant when the 2-tailed P value was less than 0.05. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software, version 5.0.

RESULTS

Reduced number of NK cells in SLE patients.

The absolute numbers of peripheral blood CD3-CD56+ NK cells were lower in patients with inactive SLE (mean \pm SD $105.4 \pm 73.5/\text{mm}^3$) ($P = 0.012$) and in those with active SLE (mean \pm SD $92.6 \pm 57.4/\text{mm}^3$) ($P = 0.007$) than in controls (mean \pm SD $203.9 \pm 134/\text{mm}^3$) (Figure 1A). However, the proportions of CD3-CD56+ NK cells were similar in SLE patients and healthy controls (Figure 1B). CD3-CD56 $^{\text{dim}}$ cytotoxic NK cells and CD3-CD56 $^{\text{bright}}$

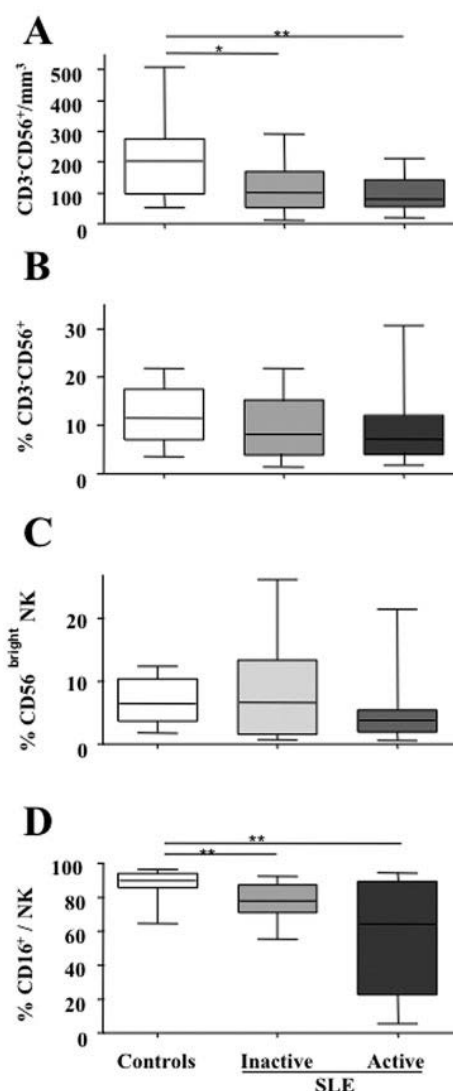


Figure 1. Characteristics of natural killer (NK) cells from systemic lupus erythematosus (SLE) patients with active disease ($n = 17$) or inactive disease ($n = 18$) compared with those of NK cells from controls ($n = 14$). **A**, Peripheral blood CD3-CD56+ NK cell count. **B**, Frequency of CD3-CD56+ NK cells, gated on lymphocytes from peripheral blood. **C**, Fluorescence-activated cell sorting profile of CD56 $^{\text{bright}}$ subpopulation gated on CD3-CD56+ NK cells. **D**, Expression of CD16 on CD56 $^{\text{dim}}$ NK cells. Data are shown as box plots. Each box represents the 25th to 75th percentiles. Lines inside the boxes represent the minimum and maximum values. Lines outside the boxes represent the mean. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$.

NK cells were distinguished based on the CD56 cell surface density. The relative proportions of both CD3–CD56+ NK cell subsets were similar in SLE patients and healthy controls (Figure 1C).

NK cell expression of inhibitory and activating receptors in SLE patients. We further compared the phenotypic properties of the CD3–CD56^{dim} NK cell subset by gating out the CD3–CD56^{bright} NK cells. CD56^{dim} NK cells of patients with SLE were indistinguishable from those of controls for cell surface expression of the major NK cell receptors, including natural cytotoxicity receptors (NKP30, NKP44, NKP46, NKP80), 2B4, and LAIR-1 (data not shown). The frequency of Fcγ receptor type IIIa (FcγRIIIa)–positive/CD16+ NK cells was profoundly decreased in patients with active SLE (to mean ± SD 60.5 ± 36%) ($P = 0.007$) and in those with inactive SLE (to mean ± SD 78.3 ± 9.8%) ($P = 0.003$) compared with that in healthy controls (mean ± SD 88.7 ± 41.5%) (Figure 1D).

We next investigated the expression pattern of the inhibitory receptor CD94/NKG2A (that recognizes HLA–E) and detected higher expression in patients with active SLE than in controls (mean ± SD 60.0 ± 21.3% versus 43.2 ± 11.6%; $P = 0.015$). The activating counterpart receptor of CD94/NKG2A, NKG2C, was also

significantly increased in patients with active SLE compared with controls (mean ± SD 16.6 ± 13.6% versus 4.8 ± 4%; $P = 0.001$). In contrast, the expression of NKG2D was similar in all samples (Figure 2A).

KIRs include KIR2DL1/KIR2DS1 and KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2 (which bind HLA–Cw ligands) and KIR3DL1/KIR3DS1 (which recognizes HLA–Bw4) (21). As shown in Figure 2B, the expression of KIR2DL1/KIR2DS1 was significantly decreased in patients with active SLE compared with both controls (mean ± SD 17.7 ± 13.8% versus 31.2 ± 17%; $P = 0.007$) and patients with inactive SLE (mean ± SD 17.7 ± 13.8% versus 26 ± 11.9%; $P < 0.05$). There were no significant differences in other KIR markers among the groups (Figure 2B). ILT-2 is an inhibitory receptor that recognizes a broad range of classic class I MHC molecules, including HLA–G, on surrounding cells. ILT-2 was expressed at higher levels both in patients with active SLE (mean ± SD 32.7 ± 23.6%) ($P = 0.04$) and in those with inactive SLE (mean ± SD 43.8 ± 23.8%) ($P = 0.02$) compared with healthy controls (mean ± SD 16.4 ± 9.3%) (Figure 2C). Importantly, the proportion of NK cells expressing CD8α, an activating receptor of NK cells (22), was decreased in patients with active SLE compared with healthy controls (mean ± SD

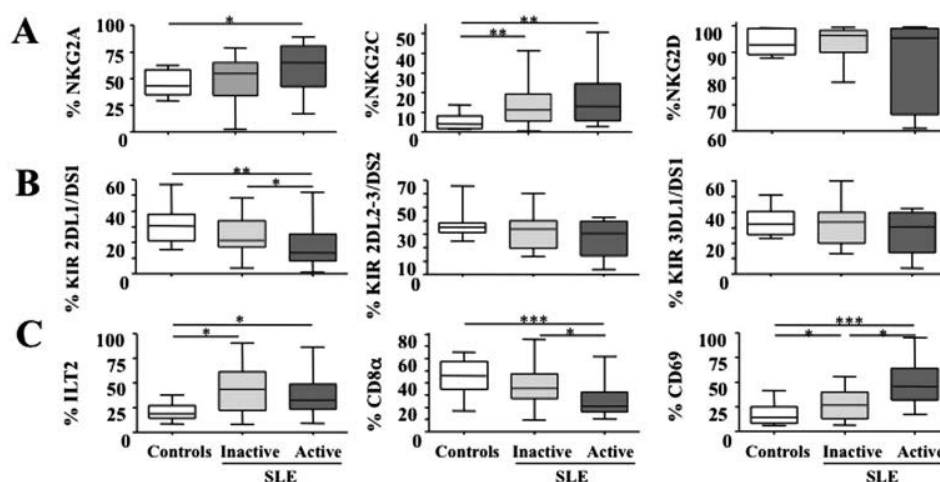


Figure 2. Pattern of receptor expression on CD3–CD56^{dim} NK cells from SLE patients with active disease ($n = 17$) or inactive disease ($n = 18$) compared with expression on cells from controls ($n = 14$). **A**, Expression of NKG2A, NKG2C, and NKG2D receptors. **B**, Expression of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs), including KIR2DL1/KIR2DS1 (KIR 2DL1/DS1), KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2 (KIR 2DL2-3/DS2), and KIR3DL1/KIR3DS1 (KIR 3DL1/DS1). **C**, Expression of other NK cell markers, including immunoglobulin-like transcript 2 (ILT-2), CD8α, and CD69. Data are shown as box plots. Each box represents the 25th to 75th percentiles. Lines outside the boxes represent the minimum and maximum values. Lines inside the boxes represent the mean. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. See Figure 1 for other definitions.

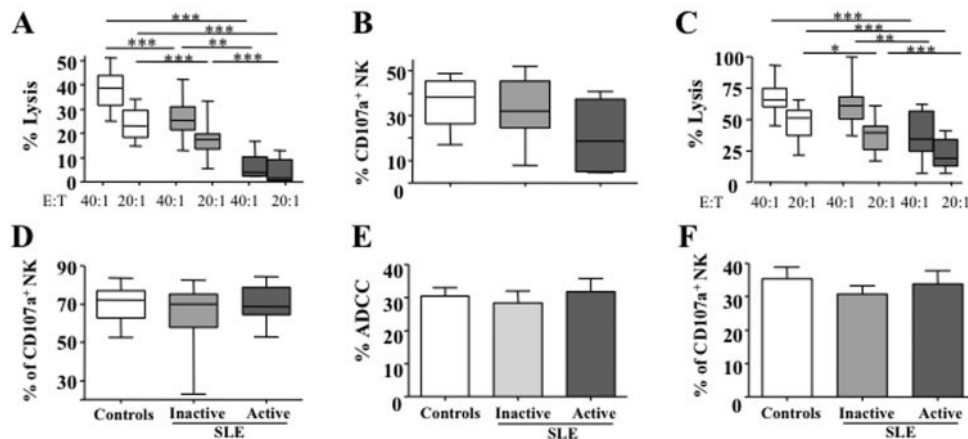


Figure 3. Cytolytic activities of NK cells from SLE patients. **A** and **C**, NK lysis of K562 target cells determined by a 4-hour ^{51}Cr release assay using nonactivated effector cells (**A**) and interleukin-2 (IL-2)-activated effector cells (**C**) at effector cell:target cell (E:T) ratios of 40:1 and 20:1. **B** and **D**, Degranulation responses against K562 target cells by CD107a cell surface expression, using nonactivated E cells (**B**) and IL-2-activated effector cells (**D**). **E**, Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against Raji cells determined by a 4-hour ^{51}Cr release assay at an E:T ratio of 40:1. **F**, Degranulation responses against Raji cells determined by CD107a cell surface expression. The numbers of samples for each assay were as follows: in **A** and **B**, from controls $n = 13$, from patients with inactive SLE $n = 20$, from patients with active SLE $n = 6$; in **C** and **D**, from controls $n = 21$, from patients with inactive SLE $n = 32$, from patients with active SLE $n = 12$; in **E** and **F**, from controls $n = 8$, from patients with inactive SLE $n = 10$, from patients with active SLE $n = 7$. Data are shown as box plots. Each box represents the 25th to 75th percentiles. Lines outside the boxes represent the minimum and maximum values. Lines inside the boxes represent the mean. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$. See Figure 1 for other definitions.

$25 \pm 13.4\%$ versus $45.3 \pm 14.3\%$; $P = 0.0009$) and compared with patients with inactive SLE (mean \pm SD $25 \pm 13.4\%$ versus $36.5 \pm 16.2\%$; $P = 0.02$) (Figure 2C).

Finally, the proportions of activated NK cells were assessed by flow cytometric determination of the early cell activation marker CD69. As shown in Figure 2C, the proportion of CD69+ NK cells was higher in patients with active SLE (mean \pm SD $47.2 \pm 22.1\%$) ($P = 0.0001$) and in those with inactive SLE (mean \pm SD $28.2 \pm 13.8\%$) ($P = 0.023$) than in controls (mean \pm SD $17.3 \pm 11\%$). Moreover, this expression was higher in patients with active SLE than in those with inactive SLE ($P = 0.011$).

Overall, these results demonstrated that the phenotype of NK cells from patients with active SLE was distinct from that of cells from healthy controls, with a higher proportion of CD94/NKG2A+, NKG2C+, ILT-2+, and CD69+ NK cells and a lower proportion of FcγRIIIa/CD16+, CD8α+, and KIR2DL1/KIR2DS1+ NK cells. They also showed decreased proportions of CD8α+ and KIR2DL1/KIR2DS1+ NK cells and an increased proportion of CD69+ NK cells in patients

with active SLE compared with patients with inactive SLE.

Cytolytic functions of NK cells in SLE patients.

The overall cytolytic activities of NK cells in SLE patients were assessed against HLA class I-negative K562 target cells. The direct cytotoxicity of nonactivated NK cells both from patients with active SLE (mean \pm SD $5.1 \pm 5.8\%$ of lysis at a 40:1 effector cell:target cell [E:T] ratio) ($P = 0.0009$) and from those with inactive SLE (mean \pm SD $26.2 \pm 7.8\%$) ($P = 0.0009$) was dramatically decreased compared with that of NK cells from healthy controls (mean \pm SD $38.5 \pm 20.2\%$) (Figure 3A). Moreover, at an E:T ratio of 40:1, NK cell cytotoxicity was significantly lower in patients with active SLE than in patients with inactive SLE ($P = 0.005$). Most of these differences also persisted after the IL-2 activation of NK cells (Figure 3C). Similar results were obtained at an E:T ratio of 20:1 (Figures 3A and C).

We further tested the level of CD107a, which reflects NK cell degranulation capacities. A slight but nonsignificant decrease in the degranulation response was observed in nonactivated NK cells from patients

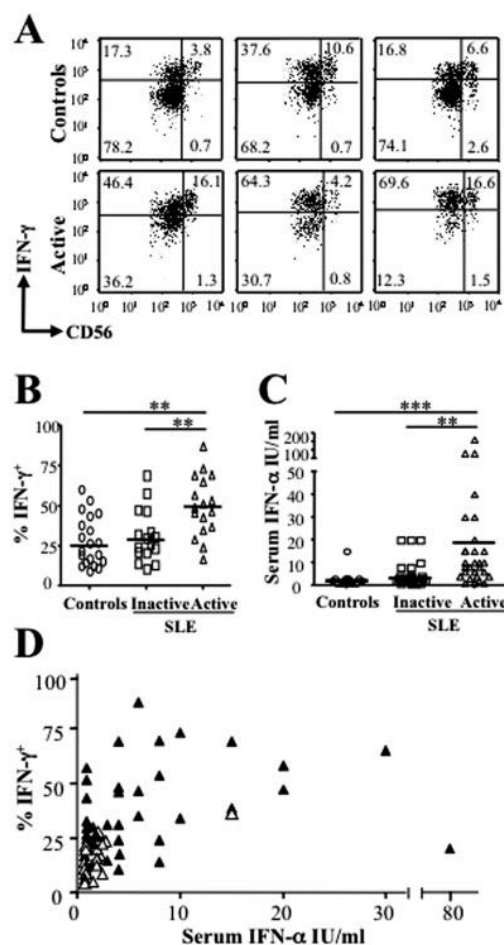


Figure 4. Type I and type II interferon (IFN) production. **A**, Representative data on intracellular IFN γ expression gated on CD3-CD56⁺ NK cells from 3 different healthy controls and 3 different patients with active SLE, after overnight incubation with interleukin-12 (IL-12) plus IL-18. The percentage of positive cells is shown for each dial. **B**, Intracellular expression of IFN γ gated on CD3-CD56⁺ NK cells, after overnight incubation with IL-12 plus IL-18. Cells were collected from healthy controls ($n = 20$), patients with inactive SLE ($n = 16$), and patients with active SLE ($n = 17$). **C**, Production of IFN α in the sera from healthy controls ($n = 14$), patients with inactive SLE ($n = 23$), and patients with active SLE ($n = 29$). **D**, Correlation of IFN α production in the sera with the percentage of IFN γ ⁺ NK cells from controls (open triangles; $n = 14$) and from patients with active or inactive SLE (solid triangles; $n = 16$ and $n = 17$, respectively). Horizontal lines in **B** and **C** represent the mean. ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$. See Figure 1 for other definitions.

with active SLE compared with those from controls (mean \pm SD 20.7 \pm 16.5% versus 37.2 \pm 14%; $P = 0.076$) (Figure 3B), whereas similar results were obtained in all groups with IL-2-activated NK cells (Figure 3D).

In addition, ADCC activities were similar in patients with active or inactive SLE and in healthy donors (Figure 3E). This finding was confirmed using a CD107a degranulation assay against Raji target cells in the presence of anti-CD20 mAb (Figure 3F). Of note, no correlation was observed between the proportion of CD16⁺ NK cells and the level of ADCC (data not shown).

Production of IFN γ by NK cells in SLE patients.

As shown in Figures 4A and B, the proportion of IFN γ ⁺ NK cells after IL-12 and IL-18 stimulation was significantly higher in patients with active SLE than in controls (mean \pm SD 50.2 \pm 18.2% versus 28.3 \pm 15.6%; $P = 0.001$). Importantly, this effect was not observed in patients with inactive SLE, in whom the proportion of IFN γ ⁺ NK cells was equivalent to that in controls (Figure 4B). Serum levels of IL-12 and IL-18, detected by enzyme-linked immunosorbent assay, were similar in controls and SLE patients (data not shown).

Positive correlation between IFN γ expression by NK cells and serum IFN α levels in SLE. Several studies have provided evidence suggesting a key role for IFN α during SLE pathogenesis (23–25). The present study confirmed significantly increased IFN α production in patients with active SLE, both compared with controls (mean \pm SD 20.8 \pm 33.5 IU/ml versus 2.9 \pm 3.6 IU/ml; $P = 0.0002$) and compared with patients with inactive SLE (mean \pm SD 20.8 \pm 33.5 IU/ml versus 5.6 \pm 6 IU/ml; $P = 0.004$) (Figure 4C). Furthermore, there was a significant correlation between the intracellular expression of IFN γ by NK cells and the serum IFN α concentration in SLE patients ($r = 0.370$, $P = 0.04$), but not in healthy controls (Figure 4D).

DISCUSSION

The results of this study demonstrated that NK cells from SLE patients display an unusual phenotype and impaired functioning. These changes are particularly evident in active SLE, and they may have the potential to affect the disease outcome.

Phenotypic analysis first disclosed an important activation of NK cells from SLE patients. Indeed, high expression of the early cell activation marker CD69 on NK cells from SLE patients revealed that those cells are strongly activated. This activation of NK cells in patients with active SLE could also reflect their capacities for

trafficking (26) and cytokine synthesis (27,28). This activation state could also explain the down-regulation of CD16, as suggested by Grzywacz et al (29).

This analysis revealed that the expression of NKG2D on NK cells was similar in patients and controls from our cohort. These data contrasted with the findings of Li et al (30). However, these discrepancies could eventually be explained by some differences in SLE organ involvement or in the treatments of the patients between both studies.

Our phenotypic findings also suggested that NK cells from patients with SLE, and especially those with active SLE, could have an impaired terminal differentiation. In vitro analysis of NK cell differentiation from CD34⁺ stem cells revealed that NK cell receptor acquisition is an orderly process. CD94/NKG2A is expressed first, followed by KIR expression (31). In accordance with these in vitro data and as previously reported by Li et al (30), CD94/NKG2A was persistently overexpressed and KIR was underexpressed in patients in the current study. This unique phenotype, showing similarities with NK cells not fully differentiated, could be confirmed by the decreased expression of both CD8 α and CD16. Indeed, it has been shown that NK cells acquire expression of CD16 at the latest state of differentiation (31).

NK cell cytotoxicity is a complex and dynamic process assumed by mature NK cells. This function requires several different intrinsic and extrinsic signals, including adhesion, activation, and degranulation, and involves several activation pathways. The results of this study demonstrated significantly decreased NK cell cytotoxicity in patients with inactive SLE and in those with active SLE. Importantly, our study showed a more important NK cell lysis defect in patients with active SLE than in those with inactive SLE. Thus, NK cell cytotoxicity was still impaired in patients with SLE, even after IL-2 activation.

In accordance with these results, Park et al (15) determined a clear correlation between the lack of NK cell cytotoxicity and both the proportions of NK cells and the effectiveness of NK cell killing processes. Furthermore, they showed decreased expression of IL-2R β (CD122), perforin, and granzyme in NK cells from SLE patients. Interestingly, our results were similar to those reported in previous series (15), although the proportion of patients with nephritis or thrombocytopenia or receiving hydroxychloroquine was slightly different in the current study. These findings seemed to be independent of the clinical spectrum of the disease and could be related to a potential effect of hydroxychloroquine through Toll-like receptors (32). In addition to this lower lysis activity, we also tested the degranulation

response of IL-2-activated and nonactivated NK cells against K562 cells. Although a slight decrease in nonactivated NK cell degranulation was observed in patients with active SLE, the degranulation capacities of NK cells should be considered equivalent in patients with SLE and controls. These data suggested that although they could not be fully differentiated, NK cells in patients with SLE are quite fully functional.

In contrast to the dramatic decrease in the natural cytotoxicity of nonactivated NK cells in patients with SLE, the ADCC of NK cells and NK cell degranulation in the presence of Raji cells were similar in SLE patients and controls. However, when using Raji cells as target cells, the level of ADCC was not related to CD16 expression. This normal ability to lyse Raji cells despite lower CD16 expression could correspond to an activation stage of NK cells rather than to a terminal differentiation impairment.

However, previous studies have shown that both the maturation and the activation of NK cells are influenced by the microenvironment and the host marrow stromal cells (33). Lucas et al found that the intensity and quality of the NK cell cytotoxic response depend on the cytokine microenvironment as well as on immune system interactions (34). These interactions include crosstalk between NK cells and dendritic cells (DCs) or T lymphocytes, occurring initially in secondary compartments such as lymph nodes (35,36). The phenotyping and functional results from the present study are consistent with these findings (34). Indeed, DCs promote NK cell maturation and activation, NK cell cytotoxicity, and IFN γ release (37) and have been implicated in SLE pathogenesis.

This study also revealed that NK cells from patients with active SLE produced high levels of IFN γ . Interestingly, Yu et al (38) observed that immature CD56^{dim} NK cells expressing CD94 (a receptor largely associated with NKG2A) produced high amounts of IFN γ , as compared with the CD56^{dim}CD94⁻ NK cell subset. Thus, CD94/NKG2A overexpression by NK cells in SLE might reflect an accumulation of less mature CD56^{dim} cells with a high potential to produce IFN γ . As demonstrated in a model of IFN γ receptor-knockout mice (39), this cytokine is one of the most important components of the immune response. Notably, IFN γ has been shown to be involved in SLE pathogenesis (40,41). This cytokine is believed to promote Th1 cell polarization (42) and to facilitate specific cytotoxicity by overexpression of class I and class II MHC molecules (43), as well as to facilitate antigen processing (44) and immunoglobulin switching (45). IFN γ was recently directly implicated in SLE pathogenesis via the induction

of soluble B lymphocyte stimulator by monocytes (40). Interestingly, Harigai et al (40) showed that both CD4+ and CD8+ T cells can contribute to the production of IFN γ in SLE patients. However, this was irrespective of SLE activity, whereas the current study demonstrated a correlation between intracellular expression of IFN γ (in response to IL-12 and IL-18) by NK cells and SLE activity.

HLA-E, the major ligand for CD94/NKG2A, is tightly up-regulated on IFN γ -induced activation, through STAT-1 α (46). Overexpression of CD94/NKG2A in active SLE could indicate a potential adverse effect mediated by high IFN γ production. This cytokine was previously reported to protect tumor or infected cells from lysis via a CD94/NKG2A-dependent pathway (47). These findings may have important biologic implications, and they support the hypothesis of Moser et al (48) that IFN γ release may lead to the enhancement of inhibitory signaling to effector cells carrying the CD94/NKG2A receptors, thereby turning off their effector functions. Our results suggest that a similar process could take place in active SLE.

This study confirmed the involvement of IFN α as a key cytokine in SLE pathogenesis, since significantly higher concentrations of IFN α were detected in patients with active SLE than in those with inactive SLE. Importantly, this study showed a direct correlation between serum IFN α levels and intracellular production of IFN γ in NK cells. This was consistent with previous reports of an inverse correlation between IFN α and cytolytic NK cell function. Moreover, the role of IFN α in inducing IFN γ synthesis by resting NK cells has been well documented during viral infections (49,50) and requires direct interactions between NK and other cell subsets, such as plasmacytoid DCs, which have also been shown to be strongly involved in SLE pathogenesis (25).

In summary, NK cells from SLE patients exhibit unique phenotypic and functional features in association with evolution of the disease. The direct correlation between NK cell capacities to produce large amounts of IFN γ and serum IFN α levels reflects a key immunoregulatory function of these cells in SLE patients, providing a link between innate and adaptive immunity. These results strongly support the development of novel immunotherapeutic strategies based on anti-IFN γ treatment in patients with active SLE.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Hervier had full access to all of

the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Hervier, Beziat, Mathian, Debré, Amoura, Vieillard.

Acquisition of data. Hervier, Beziat, Haroche, Lebon, Ghillani-Dalbin, Musset, Amoura, Vieillard.

Analysis and interpretation of data. Hervier, Beziat, Haroche, Mathian, Lebon, Ghillani-Dalbin, Musset, Amoura, Vieillard.

REFERENCES

1. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56^{bright} natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009;126:458–65.
2. Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004;306:1517–9.
3. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 2006;214:73–91.
4. Lanier LL. NKG2D in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005;560:51–6.
5. Bottino C, Moretta L, Moretta A. NK cell activating receptors and tumor recognition in humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:175–82.
6. La Cava A. Lupus and T cells. *Lupus* 2009;18:196–201.
7. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2005;175:8392–400.
8. Renaudineau Y, Pers JO, Bendaoud B, Jamin C, Youinou P. Dysfunctional B cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2004;3:516–23.
9. Erkeller-Yuksel FM, Lydyard PM, Isenberg DA. Lack of NK cells in lupus patients with renal involvement. *Lupus* 1997;6:708–12.
10. Ricciardi V, Spadaro A, Parisi G, Taccari E, Moretti T, Bernardini G, et al. Down-regulation of natural killer cells and of $\gamma\delta$ T cells in systemic lupus erythematosus: does it correlate to autoimmunity and to laboratory indices of disease activity? *Lupus* 2000;9:333–7.
11. Green MR, Kennell AS, Larche MJ, Seifert MH, Isenberg DA, Salaman MR. Natural killer cell activity in families of patients with systemic lupus erythematosus: demonstration of a killing defect in patients. *Clin Exp Immunol* 2005;141:165–73.
12. Yabuhara A, Yang FC, Nakazawa T, Iwasaki Y, Mori T, Koike K, et al. A killing defect of natural killer cells as an underlying immunologic abnormality in childhood systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996;23:171–7.
13. Sibbitt WL Jr, Gibbs DL, Kenny C, Bankhurst AD, Searles RP, Ley KD. Relationship between circulating interferon and anti-interferon antibodies and impaired natural killer cell activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1985;28:624–9.
14. Ytterberg SR, Schnitzer TJ. Inhibition of natural killer cell activity by serum from patients with systemic lupus erythematosus: roles of disease activity and serum interferon. *Ann Rheum Dis* 1984;43:457–61.
15. Park YW, Kee SJ, Cho YN, Lee EH, Lee HY, Kim EM, et al. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;60:1753–63.
16. Hochberg MC, for the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American College of Rheumatology. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
17. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang DH, and the Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992;35:630–40.
18. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004;294:15–22.

19. Beziat V, Descours B, Parizot C, Debre P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One* 2010;5:e11966.
20. Ankel H, Westra DF, Welling-Wester S, Lebon P. Induction of interferon- α by glycoprotein D of herpes simplex virus: a possible role of chemokine receptors. *Virology* 1998;251:317–26.
21. Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2004;16:626–33.
22. Addison EG, North J, Bakhsh I, Marden C, Haq S, Al Sarraj S, et al. Ligation of CD8 α on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology* 2005;116:354–61.
23. Crow MK. Type I interferon in systemic lupus erythematosus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;316:359–86.
24. Mathian A, Weinberg A, Gallegos M, Banchereau J, Koutouzov S. IFN- α induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. *J Immunol* 2005;174:2499–506.
25. Ronnblom L, Eloranta ML, Alm GV. The type I interferon system in systemic lupus erythematosus [review]. *Arthritis Rheum* 2006;54:408–20.
26. Shioh LR, Rosen DB, Brdiczka N, Xu Y, An J, Lanier LL, et al. CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 2006;440:540–4.
27. Lauzurica P, Sancho D, Torres M, Albella B, Marazuela M, Merino T, et al. Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood* 2000;95:2312–20.
28. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994;15:479–83.
29. Grzywacz B, Kataria N, Verneris MR. CD56^{dim}CD16⁺ NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases. *Leukemia* 2007;21:356–9.
30. Li WX, Pan HF, Hu JL, Wang CZ, Zhang N, Li J, et al. Assay of T- and NK-cell subsets and the expression of NKG2A and NKG2D in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2010;29:315–23.
31. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 2006;214:56–72.
32. Kalia S, Dutz JP. New concepts in antimalarial use and mode of action in dermatology. *Dermatol Ther* 2007;20:160–74.
33. Roth C, Rothlin C, Riou S, Raulet DH, Lemke G. Stromal-cell regulation of natural killer cell differentiation. *J Mol Med* 2007;85:1047–56.
34. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 2007;26:503–17.
35. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16606–11.
36. Vitale M, Della CM, Carlomagno S, Pende D, Arico M, Moretta L, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 2005;106:566–71.
37. Fernandez NC, Flament C, Crepeau F, Angevin E, Vivier E, Zitvogel L. Dendritic cells (DC) promote natural killer (NK) cell functions: dynamics of the human DC/NK cell cross talk. *Eur Cytokine Netw* 2002;13:17–27.
38. Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park IK, et al. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56^{bright} and CD56^{dim} human NK-cell subsets. *Blood* 2010;115:274–81.
39. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. *Science* 1993;259:1739–42.
40. Harigai M, Kawamoto M, Hara M, Kubota T, Kamatani N, Miyasaka N. Excessive production of IFN- γ in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J Immunol* 2008;181:2211–9.
41. Viallard JF, Pellegrin JL, Ranchin V, Schaevebeke T, Dehais J, Longy-Boursier M, et al. Th1 (IL-2, interferon- γ (IFN- γ)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1999;115:189–95.
42. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T_H1 priming. *Nat Immunol* 2004;5:1260–5.
43. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon- γ mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994;265:106–9.
44. Sijts A, Sun Y, Janek K, Kral S, Paschen A, Schadendorf D, et al. The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol* 2002;39:165–9.
45. Snapper CM, Paul WE. Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944–7.
46. Gustafson KS, Ginder GD. Interferon- γ induction of the human leukocyte antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT1 α to a distinct interferon- γ -responsive element. *J Biol Chem* 1996;271:20035–46.
47. Malmberg KJ, Levitsky V, Norell H, de Matos CT, Carlsten M, Schedvins K, et al. IFN- γ protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2002;110:1515–23.
48. Moser JM, Gibbs J, Jensen PE, Lukacher AE. CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8⁺ T cell responses. *Nat Immunol* 2002;3:189–95.
49. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999;17:189–220.
50. Marshall JD, Heeke DS, Abbate C, Yee P, Van Nest G. Induction of interferon- γ from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon- α and tumour necrosis factor- α . *Immunology* 2006;117:38–46.

DOI 10.1002/art.34587

Mycophenolate mofetil in the treatment of systemic lupus erythematosus: comment on the article by Hervier et al

To the Editor:

We read with great interest the article by Hervier et al (Hervier B, Beziat V, Haroche J, Mathian A, Lebon P, Ghillani-Dalbin P, et al. Phenotype and function of natural killer cells in systemic lupus erythematosus: excess interferon- γ production in patients with active disease. *Arthritis Rheum* 2011;63:1698–706). We would like to ask for an explanation on the following point.

In the Patients and Methods section, the authors noted that “All but 5 patients received hydroxychloroquine (200 or 400 mg daily) and/or oral prednisone (<0.5 mg/kg daily). A total of 15 patients received a stable dosage of mycophenolate mofetil (2 gm daily) for at least 3 months.” This suggests that there would be differences in treatment between the group with active systemic lupus erythematosus (SLE) and the group with inactive SLE. We would like to know how the authors accounted for this. In addition, because the SLE patients studied by Hervier and colleagues were undergoing treatment, we wonder if “treatment impact” or similar language should have been added to the title of the article.

Zhuang Ye, MMSc
Zhengyu Jiang, PhD
Yanfang Jiang, PhD
First Hospital of Jilin University
Changchun, China

have biased our findings. To address this issue, we performed subanalyses restricted to patients with SLE who were not treated with mycophenolate mofetil. We found that all phenotypic and functional differences in NK cells observed between patients with active disease and those with inactive disease remained statistically significant. The mean cytolytic activity of NK cells remained significantly lower in patients with active SLE than in patients with inactive SLE, whereas the intracellular expression of interferon- γ by NK cells remained higher in patients with active disease as compared to patients with inactive disease (Table 1). These results are consistent with those reported in previous publications (1–6). We therefore assume that the differences observed between active and inactive SLE are linked to SLE pathogenesis and activity rather than to immunosuppressive treatments.

Baptiste Hervier, MD
Pitié-Salpêtrière Hospital
AP-HP
Université Pierre et Marie Curie
and INSERM UMR-S 945
Vincent Vieillard, PhD
INSERM UMR-S 945
and Université Pierre et Marie Curie
Paris, France

1. Green MR, Kennell AS, Larche MJ, Seifert MH, Isenberg DA, Salaman MR. Natural killer cell activity in families of patients with systemic lupus erythematosus: demonstration of a killing defect in patients. *Clin Exp Immunol* 2005;141:165–73.
2. Park YW, Kee SJ, Cho YN, Lee EH, Lee HY, Kim EM, et al. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;60:1753–63.
3. Riccieri V, Spadaro A, Parisi G, Taccari E, Moretti T, Bernardini G, et al. Down-regulation of natural killer cells and of γ/δ T cells in systemic lupus erythematosus: does it correlate to autoimmunity and to laboratory indices of disease activity? *Lupus* 2000;9:333–7.
4. Sibbitt WL Jr, Gibbs DL, Kenny C, Bankhurst AD, Searles RP, Ley KD. Relationship between circulating interferon and anti-interferon antibodies and impaired natural killer cell activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1985;28:624–9.
5. Yabuhara A, Yang FC, Nakazawa T, Iwasaki Y, Mori T, Koike K, et al. A killing defect of natural killer cells as an underlying

DOI 10.1002/art.34586

Reply

To the Editor:

We thank Ye et al for their interest in our article. They raise the question of whether mycophenolate mofetil had an effect on natural killer (NK) cells and whether that effect could

Table 1. Functions of NK cells from SLE patients who were not treated with mycophenolate mofetil*

	Cytolytic activity of NK cells†			Intracellular expression of IFN γ by NK cells‡		
	Active (n = 7)	Inactive (n = 31)	P	Active (n = 11)	Inactive (n = 16)	P
% of K562 target cell lysis at 40:1 effector cell:target cell ratio	60.3 \pm 15	35.4 \pm 18.2	0.0072	–	–	–
% of K562 target cell lysis at 20:1 effector cell:target cell ratio	38.5 \pm 12.9	19.1 \pm 8.6	0.0024	–	–	–
% of IFN γ -positive NK cells	–	–	–	48.7 \pm 19.1	31.7 \pm 16.4	0.0281

* Quantitative data were compared by Mann-Whitney U test. Values are the mean \pm SD.

† Cytolytic activity of natural killer (NK) cells was assessed in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) by NK lysis of K562 target cells using interleukin-2 (IL-2)-activated NK cells.

‡ Intracellular expression of interferon- γ (IFN γ) by NK cells was assessed after overnight incubation with IL-12 plus IL-18.

1.2. Synthèse des résultats

Les résultats de ce travail indiquent qu'il existe au cours du Lupus Systémique :

- i) Un défaut quantitatif des cellules NK dans le sang périphérique associée à une lymphopénie globale suggérant que le déficit NK n'est pas spécifique. Il n'est pas non plus lié à l'activité de la maladie. Il est de plus important de signaler que la proportion des deux sous-populations de cellules NK circulantes (CD56^{dim} et CD56^{bright}) n'est pas affectée.
- ii) Des anomalies phénotypiques des cellules NK, impliquant l'augmentation de la proportion de cellules CD94/NKG2A⁺ ou la diminution du niveau d'expression du CD16a ont été constatées. De plus, certaines modifications observées, dont l'augmentation du CD69 et la diminution de CD8 α et de KIR 2DL1/DS1, sont d'autant plus marquées que le Lupus Systémique est actif.
- iii) Comme antérieurement décrit, mais de façon surprenante comparativement aux infections virales [54], la cytotoxicité naturelle, mise en évidence par un test de relargage de ⁵¹Cr vis-à-vis de cibles K562, est effondrée. Et ceci d'autant plus que la maladie est active. En revanche, le niveau d'ADCC n'est pas modifié.
- iv) La capacité de production d'IFN γ , obtenue par stimulation standardisée par de l'IL12 et de l'IL18 est significativement augmentée chez les patients actifs. De plus, il existe une corrélation statistique forte avec les concentrations sériques d'IFN α , cytokine clef de l'immunopathologie de la maladie.

1.3 Discussion complémentaire

La présence au cours du Lupus Systémique d'un phénotype NK de type CD69⁺NKG2A⁺CD16^{low}KIR⁻CD8 α ⁻ associé à un défaut de cytotoxicité naturelle et à une forte production d'IFN γ confirme le caractère « immature » de ces cellules, préalablement suggéré par *Park YW et coll.* [283]. Il est important de noter dans ce contexte de diminution de l'expression de certains KIRs, que des analyses préliminaires du Kyrotype n'avaient pas retrouvé dans notre cohorte de patients (n=42, *résultats non montrés*) d'association particulière avec le Lupus Systémique, à la différence de ce qui a pu être suggéré par d'autres équipes [20,21].

Park & coll. avaient suggéré que le déficit quantitatif en NK circulants, associé à un défaut phénotypique et fonctionnel pouvait être imputable à un défaut de production et de maturation médullaire des cellules NK, lié à des anomalies intrinsèques (diminution de c-kit par exemple). Toutefois, d'autres hypothèses sont envisageables dont celles d'une apoptose accrue et/ou d'un

afflux de cellules NK dans les tissus cibles. Ces hypothèses ont été étayées par *Huang Z et coll.* [284] qui ont également constaté une lymphopénie NK chez les patients actifs. Ces auteurs ont montré *ex vivo* que l'IFN α est responsable de l'activation des cellules NK mais aussi de leur apoptose. Les cellules NK affectées sont celles qui expriment CD226+ (DNAM-1), un récepteur activateur dont les ligands sont exprimés essentiellement par les cellules dendritiques : CD122 et CD155. Dans un modèle murin prédisposé au Lupus Systémique (MRL/lpr), des cellules NK ayant ce phénotype infiltraient le rein, l'un des principaux tissus cibles de la maladie [284]. Bien que non formellement démontré, il semblerait que les cellules NK, en présence d'IFN α , s'activeraient et migreraient dans les tissus cibles du Lupus Systémique pour y jouer un rôle délétère (production locale d'IFN γ et de granules cytotoxiques) avant d'entrer en apoptose.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux suggère que l'IFN α joue un rôle majeur dans les processus impliquant les cellules NK au cours du Lupus Systémique. Cependant, il n'est pas clairement démontré si l'IFN α agit isolément ou en collaboration avec d'autres facteurs solubles ou cellulaires.

2. Liens entre NKG2A et Auto-immunité

2.1 Introduction

L'une des principales anomalies phénotypiques observée sur les cellules NK au cours du Lupus Systémique est le niveau élevé d'expression de NKG2A (récepteur inhibiteur ayant pour ligand HLA-E [36]). Différents travaux ont également montré que ce ligand interagit également avec NKG2C, contrepartie activatrice de NKG2A, dont la présence à la surface des cellules NK signe un état pathologique particulier : NKG2C est par exemple très fortement associé à différentes pathologies infectieuses [48], lesquelles n'ont pas été spécifiquement recherchées dans l'étude phénotypique précédente.

Bien qu'il n'y ait pas de corrélation évidente entre l'activité du Lupus Systémique, l'IFN α et l'expression de NKG2A dans notre cohorte de patients (*résultat non montré*), il semblait tout de même intéressant d'évaluer les liens potentiels entre NKG2A et l'auto-immunité. Ayant eu l'occasion de prendre en charge une patiente présentant une prolifération indolente à cellules NK de phénotype NKG2A^{high}, NKG2C^{high}, KIR^{low} (donc proche du phénotype constaté pour les patients au cours du Lupus Systémique), il semblait intéressant d'étudier la fonctionnalité des cellules NK anormales et de rechercher activement chez cette patiente cliniquement asymptomatique des signes de maladies auto-immunes, incluant le Lupus Systémique. En effet, les lymphoproliférations indolentes à grands lymphocytes granuleux – dont certaines sont des proliférations de cellules NK- sont des situations pathologiques qui peuvent s'associer voire induire des maladies auto-immunes [109].

Correspondence

To the editor:

Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells

In April 2009, we saw a 64-year-old woman with persistent indolent proliferation of CD3⁺CD56⁺ large granular lymphocytes.¹ She had no other clinical symptoms and no autoimmune events, and her clinical course has remained benign over 22 months. Neither clinical nor imaging studies have shown signs of lymphoma or acute infection. IgG serology is negative for HIV-1/2, human T cell lymphotropic virus (HTLV)-1/2, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HHV8, and positive for EBV, CMV, HSV, and varicella zoster virus. Most notably, we have observed an elevated lymphocyte count, ranging from 5.2 to 8.0 × 10⁹/L, extremely unbalanced with CD3⁺CD56^{dim} natural killer (NK) cells accounting for 62.0%–83.2% of lymphocytes overall (Figure 1A). Intriguingly, more than 95% of the NK cells simultaneously coexpress inhibitory NKG2A and triggering NKG2C receptors (Figure 1B), although coexpression of these markers is generally observed in only 1%–2% of decidual and peripheral blood NK cells from healthy donors.^{2–4} However, half of NK cells express HLA-DR, an activation marker, and present an intermediate cell-differentiation phenotype with a high proportion of CD57⁺ cells and an insignificant quantity of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) (Figure 1C–D),⁴ although her genome includes all KIR variants.

Consistent with recent studies exploring the relation between NK-cell responsiveness and receptors that engage self-MHC class I molecules,⁵ polyfunctional analysis showed that this patient's KIR⁺NKG2A⁺NKG2C⁺ NK cells were fully functional against MHC class I-deficient target cells (K562, and 721.221) and capable of antibody-dependent cellular cytotoxicity (Figure 1E).

Inhibitory NKG2A and activating NKG2C receptors are both specific for HLA-E, a nonclassical MHC class Ib molecule expressing peptides derived from signal sequences of other HLA class I molecules.⁶ Given their opposing functional effect, the coexpression of both markers raises the question of how NK cells can establish self-tolerance under this circumstance, as the lack of symptoms shows they do. A redirected killing assay against FcγR⁺ P815 targets in the presence of anti-NKG2C mAb showed that the NKG2C was functional, but more interestingly, costimulation of NKG2A and NKG2C with their respective mAbs demonstrated that the inhibitory function of NKG2A prevailed (Figure 1F). The NKG2A⁺NKG2C⁺ NK cells were clearly less polyfunctional against targets expressing HLA-E than against wild-type 721.221 cells (Figure 1E), and HLA-E⁺ target interaction inhibited NK-cell proliferation, except in the presence of IL-2 (Figure 1G), as described.⁷ A redirect killing assay confirmed that simultaneous engagement of NKG2C and IL-2 induced a marked proliferative response, abrogated by NKG2A engagement (Figure 1H).

We therefore report that the NKG2A inhibitory receptor plays a central inhibitory role, providing a regulatory feedback mechanism for controlling the activating NKG2C receptor, reminiscent of the activation-dependent expression of CTLA-4 on T lymphocytes that counteracts CD28-mediated costimula-

tion.⁸ These findings are consistent with the higher affinity of NKG2A for HLA-E, which likely favors its competition with NKG2C for ligand engagement.⁹

To our knowledge, this case provides the first in vivo evidence that, in the absence of KIR, expression of NKG2A on NKG2C⁺ NK cells establishes an inhibitory threshold that prevents their potential autoreactivity against self-HLA-E⁺ cells and explains this woman's absence of autoimmune disorders or collateral damage.

In accordance with national ethics committee guidelines, the patient provided written informed consent before peripheral blood samples were collected for this study.

Vivien Béziat

Inserm UMR-S 945, Immunité et Infection, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Baptiste Hervier

Service de Médecine Interne, French reference center for auto-immune diseases, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Abila Achour

Inserm UMR-S 945, Immunité et Infection, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

David Boutolleau

UMPC Univ Paris 06, ERI DETIV, F-75013, and Service de Virologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, AP-HP, F-75013, Paris, France

Anne Marfain-Koka

Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Antoine-Bécère, Clamart, France

Vincent Vieillard

Inserm UMR-S 945, Immunité et Infection, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Acknowledgments: This study was supported in part by Inserm and the Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Contribution: V.B. and V.V. performed the research, analyzed the data, and drafted the manuscript; A.A. performed the research; and B.H., D.B., and A.M.-K. conducted the clinical study and analyzed the data.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Vincent Vieillard, Inserm UMR-S 945, Immunité et Infection, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France; e-mail Vincent.vieillard@upmc.fr.

References

1. Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, Oshimi K, Loughran TP Jr. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood*. 1997;89(1):256–260.
2. Kusumi M, Yamashita T, Fujii T, Nagamatsu T, Kozuma S, Taketani Y. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol*. 2006; 70(1–2):33–42.
3. Sáez-Borderías A, Romo N, Magni G, Gumá M, Angulo A, López-Botet M. IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor

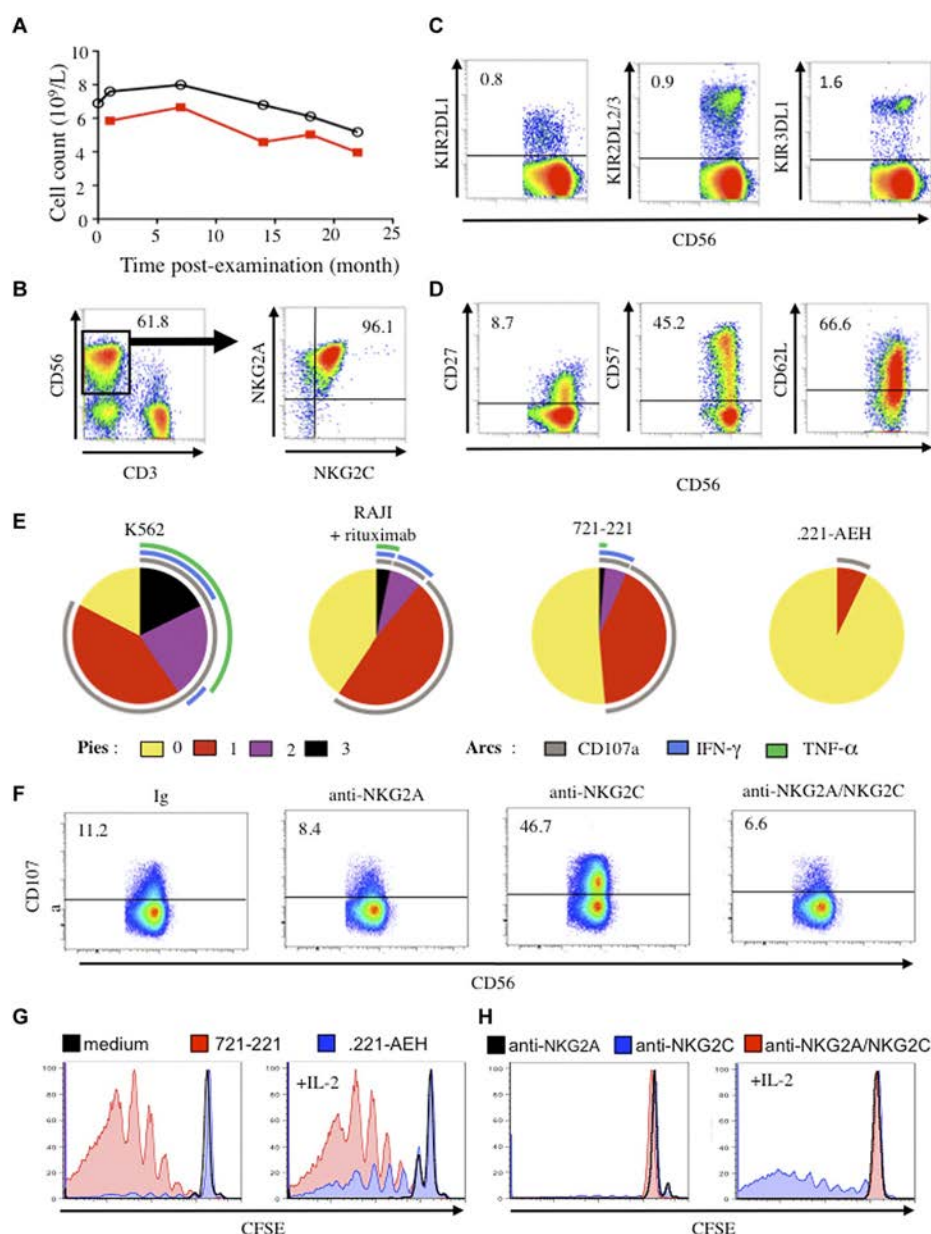


Figure 1. Phenotypic and functional features of NK cells. (A) Number of lymphocytes (black line) and CD3⁺CD56⁺ NK cells (red line) over the examination period. (B) Flow cytometric analysis of CD3⁺CD56⁺ NK cells among lymphocytes and coexpression of NKG2A and NKG2C on NK cells. (C) Expression of inhibitory KIR (KIR2DL1, KIR2DL2/3, and KIR3DL1) on CD3⁺CD56⁺ NK cells. (D) Expression of CD27, CD62L, and CD57 cell-differentiation markers on CD3⁺CD56⁺ NK cells. Numbers correspond to the proportion of positive cells. (E) Polyfunctionality assays of resting CD3⁺CD56⁺ NK cells tested against various targets including K562, 721.221, .221-AEH, and Raji cells in the presence of 1 μ g/mL rituximab (E/T ratio of 1/1). Cells were stained with mAbs for CD107a degranulation, and intracellular production of IFN- γ and TNF- α . All data were analyzed with the Boolean gate algorithm of Flow Jo Version 8.8 (TreeStar). Pestic software Version 1.6 was used to remove the background, and pie charts, generated using the Spice software Version 5.2 (NIAI freeware), present the frequency of NK cells positive for 0, 1, 2, or 3 responses (to CD107a, IFN- γ , and TNF- α). Arcs depict the frequency of cells positive for CD107a, IFN- γ , and/or TNF- α , as described.¹⁰ (F) Redirect killing assays of CD3⁺CD56⁺ NK cells against the P815 cell line in the presence of 5 μ g/mL mAbs specific for NKG2A and NKG2C, or the matched isotype control (Ig) (E/T ratio of 1/1). Numbers correspond to the proportion of positive cells. (G) Proliferation of NK cells after stimulation for 7 days with IL-2 and/or irradiated P815 cells plus anti-NKG2A, anti-NKG2C, or both mAbs, measured by cell dilution of CFSE. (H) Proliferation of NK cells after stimulation for 7 days with IL-2 and/or irradiated P815 cells plus anti-NKG2A, anti-NKG2C, or both mAbs, measured by cell dilution of CFSE.

- p regulates CD94/NKG2C+ NK cell function.
- J Immunol.*
- 2009;182(2):829-836.
4. Béziat V, Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS ONE.* 2010;5(8):e11966.
 5. Joncker NT, Fernandez NC, Treiner E, Vivier E, Raulet DH. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol.* 2009;182(8):4572-4580.
 6. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* 1998;391(6669):795-799.
 7. Björkström NK, Lindgren T, Stoltz M, et al. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med.* 2011;208(1):13-21.
 8. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515-548.
 9. Valés-Gómez M, Reyburn HT, Erskine RA, López-Botet M, Strominger JL. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J.* 1999;18(15):4250-4260.
 10. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 2010; 115(11):2167-2176.
-

2.2. Interprétation des résultats

Dans ce cas clinique, les disparités fonctionnelles des cellules NK qui résultent de l'expression anormale de certains récepteurs membranaires n'étaient pas à l'origine d'auto-immunité. Ces travaux ont permis de confirmer que le signal inhibiteur médié par CD94/NKG2A contourne ou surpasse le signal activateur associé à CD94/NKG2C, ayant pour conséquence une inhibition de la lyse NK vis-à-vis d'une cible exprimant HLA-E. Ce résultat pourrait en partie expliquer l'absence de phénomènes auto-immuns.

2.3. Discussion complémentaire

Ainsi, la surexpression de NKG2A jouerait plutôt un rôle protecteur, comme cela a pu être suggéré récemment par la découverte chez une patiente atteinte de Lupus Systémique sévère d'anticorps anti-NKG2A ayant un effet bloquant [285]. En effet, en inhibant la voie CD94/NKG2A, ces anticorps pourraient permettre l'activation des cellules NK (via CD94/NKG2C notamment, qui n'est pas affecté par la présence de ces anticorps), et donc leur laisser jouer un rôle délétère. Ce mécanisme, est discordant avec à ce qui a pu être envisagé dans des modèles murins [286], mais souligne la complexité des interactions des cellules NK avec les autres types cellulaires du système immunitaire inné ou adaptatif.

La lecture de deux observations rares de prolifération indolente de cellules NK associés à des manifestations auto-immunes [282,287] ainsi qu'un cas personnel d'une patiente similaire atteinte de Sclérodémie Systémique, pourrait également suggérer l'implication de CD56 dans la survenue d'auto-immunité dans ce contexte particulier. En effet, dans ces cas exemplaires, les cellules NK anormales avaient perdu l'expression du CD56 à leur surface. Toutefois, des données complémentaires sont nécessaires pour étayer cette hypothèse.

3. Modes spécifiques d'activation des cellules NK au cours du Lupus Systémique

Cette étude complémentaire vise à comprendre les voies cellulaires aboutissant à l'activation des cellules NK au cours du Lupus Systémique. Sa soumission pour publication (« Involvement of Toll-like receptor 9 in the activation of natural killer cells in Systemic Lupus Erythematosus », B. Hervier & coll.) nécessite l'obtention de données expérimentales complémentaires : elle est donc présentée en Français dans un format de type « Mémoire » plutôt que sous forme de manuscrit en Anglais. Les figures et la bibliographie sont référencées indépendamment du reste de la thèse.

3.1. Introduction

L'implication des cellules NK dans l'immunopathologie du Lupus Systémique a été suggérée par différentes études. Notamment, différents travaux, dont ceux présentés en première partie des *Résultats*, montrent que les cellules NK présentent un phénotype immature (**Park YW, 2009**) et qu'elles ont de plus grandes capacités à produire de l'IFN γ suite à la stimulation par différentes cytokines. Par ailleurs un lien statistique entre cette la capacité des cellules NK à produire de l'IFN γ et les taux sériques d'IFN α chez les patients a pu être mis en évidence. Or, des données obtenues hors contexte auto-immun (**Marshall JD, 2006**) suggèrent également un lien immunopathologique entre ces deux cytokines, reliant ainsi l'immunité innée à l'immunité adaptative. Néanmoins, dans un contexte d'auto-immunité, un tel mécanisme n'a jamais été pas clairement élucidé. Pourtant l'IFN α est la cytokine clef du Lupus Systémique (**Rönnblom L, 2011**). Elle corrèle avec l'activité de la maladie et il a été démontré que l'IFN γ était aussi impliquée dans l'immunopathologie de cette maladie (**Harigai M, 2008**).

Au cours du Lupus Systémique, l'IFN α est produite majoritairement par les pDCs suite à l'activation de la voie des TLR 7 et TLR9. Ces derniers sont des récepteurs intracellulaires aux signaux de danger qui ont pour ligands des molécules synthétiques, des ARN ou ADN endogènes ou viraux ou encore des complexes immuns contenant des acides nucléiques (**Baccala R, 2007**), comme ceux qui sont décrits au cours du Lupus Systémique. Différents travaux préalables ont montré que les cellules NK expriment également les TLR7 et TLR9 au niveau intra-cytoplasmique dans les endosomes (**Sivori S, 2004**). Outre l'IFN α , les ligands de ces TLRs pourraient donc activer directement les cellules NK, ce d'autant qu'elles expriment différentes molécules ou récepteurs pouvant permettre l'internalisation des ligands de ces TLRs. Par analogie à ce qui a été décrit pour les pDCs (CD32) ou les lymphocytes B (*B-cell receptor*), les cellules NK expriment notamment le CD16a qui peut lier les complexes immuns circulants.

A partir de ces données et afin de préciser les mécanismes d'activation des cellules NK au cours du LES, une exploration de l'implication de la voie TLR9 dans l'activation des cellules NK au cours du LES ainsi que son interaction avec ses ligands synthétiques (comme le CpG ODN 2216) ou physiologiques (ADN double brin) a été envisagée. Dans ce contexte, l'influence de ces différents paramètres, de l'IFN α et d'éventuelles interactions cellulaires sur l'activation et la fonctionnalité des cellules NK a été évaluée.

3.2. Patients et Méthodes

3.2.1. Patients

Entre janvier 2013 et avril 2014, 54 patients (51 femmes, 3 hommes, d'âge moyen 39 ± 13 ans), suivis dans le Service de Médecine Interne 2 de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France, Centre National de référence pour le Lupus Systémique, ont été inclus dans cette étude (*Table 1*). Les patients répondaient aux critères de classification en vigueur pour le Lupus Systémique (**Petri M, 2012**). Les paramètres cliniques, biologiques, immunologiques et thérapeutiques ont été recensés. Le Lupus Systémique était considéré actif en cas de SLEDAI >4 . Les patients ont été comparés à 25 témoins sains (21 femmes, 4 hommes, d'âge moyen 27 ± 8 ans).

3.2.2. Préparations, tris et cultures cellulaires

Les PBMCs des patients et contrôles ont été isolées à partir d'échantillon de sang frais, par gradient de Ficoll (Eurobio®). Les cellules ont été cultivées à 37°C overnight à 2×10^6 de cellules/mL. Un tri des cellules NK a été réalisé par sélection négative sur colonne magnétique (Miltenyi Biotec®). Les cellules NK triées ont été cultivées overnight à la concentration de 10^6 cellules/mL. Différentes conditions de stimulations ont été testées:

- **CpG ODN 2216** (InVivoGen®), un ligand synthétique de TLR9, à la concentration de 5 μ M/mL.
- **IFN α -2a** (Roche®) à 1500 UI/mL.
- **ADN circulant** autologue ou hétérologue (patients actifs) après extraction à partir du sérum (Kit Qiagen®), à la concentration de 100 ng/mL.
- **Immunoglobulines humaines polyvalentes** (Clairyg, LFB®) à 1 mg/mL.
- **Immunoglobulines G (IgG) purifiées** à partir du sérum de 2 patients actifs présentant uniquement des auto-anticorps des anti-ADN double brin (test de Farr) à la concentration de

Table 1 : Caractéristiques des patients et contrôles.

HCQ : Hydroxychloroquine ; * mesuré à partir du sang total, par méthode de chromatographie liquide (*Costedoat-Chalumeau N, Arthritis Rheum, 2007*).

	Contrôles	Total LES	LES sans HCQ		LES traités par HCQ	
			Actifs	Inactifs	Actifs	Inactifs
Nombre Individus	25	54	13	19	7	15
Sexe ratio (% Femmes)	84	94	85	95	100	100
Age médian (extrêmes)	27 (22-47)	39 (18-74)	41 (23-60)	38 (27-74)	40 (22-55)	30 (18-52)
SLEDAI médian (extrêmes)	-	4 (0-16)	8 (5-14)	2 (0-4)	8 (6-16)	2 (0-4)
Prednisone, n (%)	-	34 (63)	10 (77)	8 (42)	6 (86)	10 (67)
Dose médiane Prednisone (extrêmes)	-	5 (0-40)	7 (0-40)	0 (0-16)	7 (0-20)	7 (0-15)
Mycophénolate Mophetil, n (%)	-	6 (11)	1 (8)	3 (16)	0	2 (13)
Dosage médian HCQ sanguin* (ng/ml)	-	-	-	-	883 (325-2260)	1054 (856-1716)

1 mg/ml (dosage vérifiés par néphélométrie, Behring®). La purification des IgG a été faite sur colonne de chromatographie couplée à de la protéine G (Thermo Scientific®). Les IgG ont été concentrées à l'aide de filtres de centrifugation (Centricon, Millipore®).

- **Corps apoptotiques autologues** générés par isolément des polynucléaires neutrophiles et induction d'apoptose par la Cycloheximide (Calbiochem®) à la dose de 10 mg/mL pendant 20h. La proportion de cellules en apoptose a été vérifiée par cytométrie en flux (marquages par le CD15, l'Annexin-V et le 7-aminoactinomycin D) et était supérieure à 70%. Après centrifugation des cellules en apoptose, l'isolement des corps apoptotiques a été effectué par ultracentrifugation du surnageant (75000 g, 30 minutes).
- **Anticorps neutralisant anti-CD118** (IFNAR-2, antibodyOnline®) à la concentration de 10 µg/mL, ajoutés aux cultures 1h avant une autre stimulation.
- **Cathélicidine : LL-37** (Innovagen®) à la concentration de 1 µg/mL.

3.2.3. Immunophénotypage Lymphocytaire

Les cellules NK sont définies en cytométrie en flux (FACS Gallios, Beckman-Coulter®) sur la fenêtre CD45⁺CD3⁺CD56⁺. Elles ont été caractérisées à partir d'un cocktail d'anticorps membranaires associant notamment des anticorps anti-CD69, DNAM-1, NKG2A et CD16. Le marquage intracellulaire de TLR9-PE (Imgenex®) a été réalisé après perméabilisation cellulaire (BD Cytotfix/Cytoperm®).

3.2.4. Tests de polyfonction

Les tests de dégranulation ont été réalisés, en condition standard, après incubation des cellules effectrices (PBMCs ou cellules NK purifiées) en présence ou non de cellules cibles K562, au ratio Effecteur/Cible de 1:1, pendant 5 heures, après addition de Monensine et Brefeldine (Sigma®) au bout d'une heure. La dégranulation a été évaluée en utilisant un anti-CD107a-FITC (BD-Bioscience®) et la production d'IFNγ avec un anticorps anti-IFNγ-AF700 (BD-Bioscience®).

3.2.5. Dosages d'IFNα sériques

Les dosages sériques d'IFNα ont été effectués par mesure de l'activité antivirale au cours d'un test cytopathique, comme décrit antérieurement (*Résultats 1*). Ces tests étaient réalisés après unique décongélation des sera (n=15). Les sera étaient congelés à -80°C après centrifugation de 10 minutes à 2000g, moins d'une heure après que le prélèvement ait été effectué.

3.2.6. Statistiques

Les comparaisons entre les différents groupes de sujets ont été réalisées en utilisant le Logiciel GarphPad 5.0b : les comparaisons de données quantitatives non appariées par des Tests de Mann-Whitney et les données quantitatives appariées par des Tests de Wilcoxon (sauf si précisé). La corrélation entre deux variables quantitatives a été réalisée par des Tests de Spearman. Seules des valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme significatives et sont présentées comme ceci : $p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$, $p < 0,05 = *$.

3.3. Résultats

3.3.1. Etude de l'expression de TLR9 par les cellules NK au cours du Lupus Systémique

Afin de déterminer si la voie d'activation TLR9 est impliquée au niveau des cellules NK au cours du Lupus Systémique, un immunophénotypage des NK circulants a été réalisé.

3.3.1.1. Niveau d'expression intracellulaire de TLR9 par les cellules NK

i) Comparaison de l'expression de TLR9 entre patients actifs, inactifs et sujets contrôles

Le niveau d'expression de TLR9 par les cellules NK (intensité moyenne de fluorescence) est significativement augmenté chez les patients présentant un Lupus Systémique actif vs inactif (95 ± 61 vs 38 ± 21 ; $p < 0,001$). Néanmoins, le niveau d'expression de TLR9 par les cellules NK des contrôles est hétérogène et pas significativement différent de celui des patients actifs (64 ± 37 ; $p = 0,074$).

ii) Impact du traitement par Hydroxychloroquine sur l'expression de TLR9 *ex vivo*

Comme le mode d'action de l'hydroxychloroquine (HCQ) est l'inhibition de l'acidification des vésicules endosomales dans lesquelles se trouve TLR9 (*Yi AK, 1998*), les patients recevant ce traitement, qui est couramment utilisé au cours du Lupus Systémique, ont été dissociés de ceux qui n'en recevaient pas : le marquage de TLR9 est effectivement significativement diminué chez les patients recevant ce traitement (38 ± 20 vs 80 ± 59 ; $p = 0,005$). Parmi les patients atteints de Lupus Systémique ne recevant pas d'HCQ (*Figure 1A*), ceux avec un Lupus Systémique actif ont un niveau d'expression de TLR9 significati-

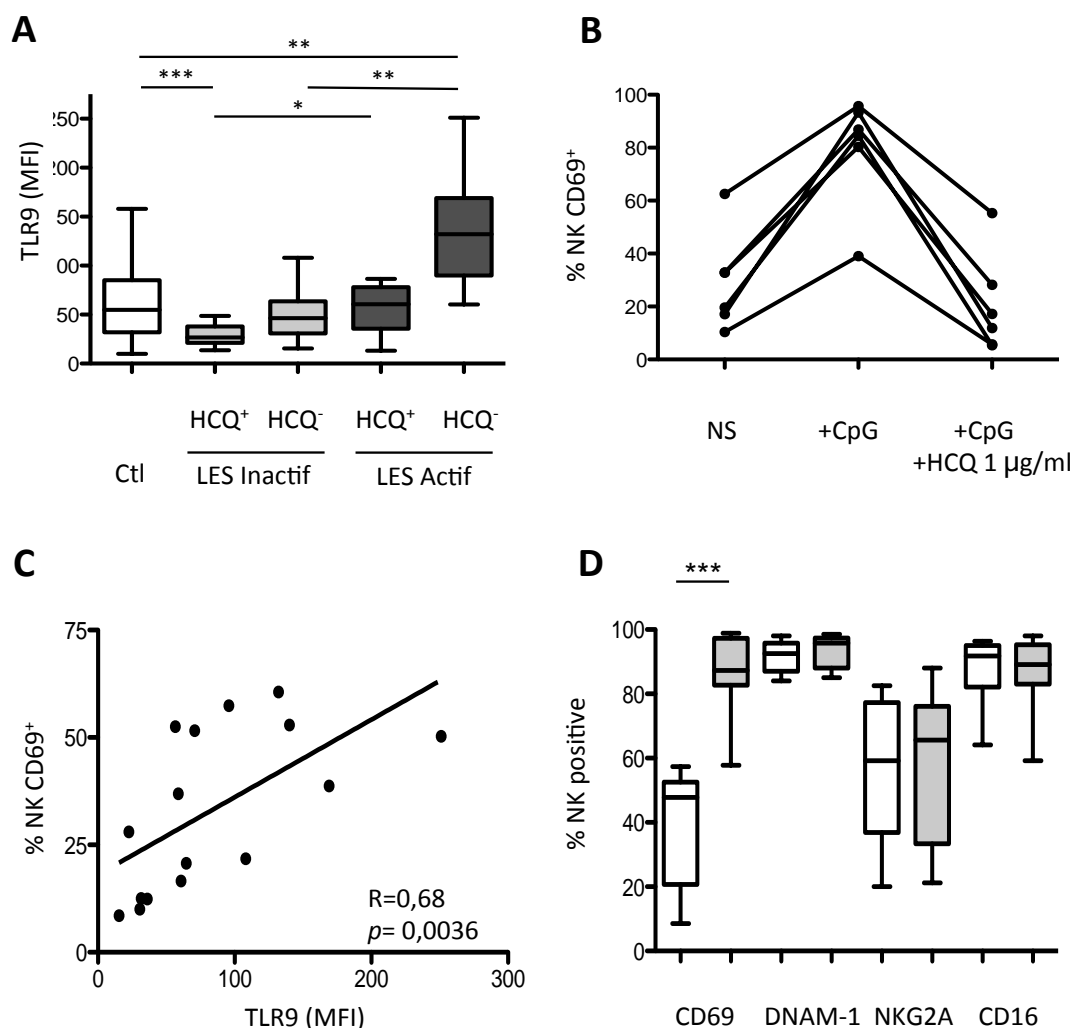


Figure 1 : Expression intracellulaire de Toll-like recepteur 9 (TLR9) au cours du Lupus systémique et corrélations phénotypiques

A. Comparaison des niveaux d'expression du TLR9 intra-cytoplasmique par les cellules NK de sujets contrôles (Ctl) et de patients atteints de Lupus Systémique selon l'activité de la maladie et la prise éventuelle d'Hydroxychloroquine (HCQ). **B.** Abolition *in vitro* de l'effet activateur de CpG-ODN 2216 par l'HCQ (n=6 contrôles) : cultures de PBMCs stimulées par CpG ODN 2216 (5 µM/mL) en présence ou non d'HCQ ajouté 1 heure avant la stimulation par le CpG à la concentration de 1 µg/mL. **C.** Corrélation entre le niveau d'expression de TLR9 intra-cellulaire et l'activation des cellules NK (marquage membranaire par le CD69). **D.** Comparaison des phénotypes des cellules NK selon qu'elles expriment TLR9 (boîtes grises) ou non (boîtes blanches). NS : non stimulé. MFI : Fluorescence d'intensité moyenne. * : 0.01 < p ≤ 0,05 ; ** 0,01 < p ≤ 0,001 ; *** p < 0,001.

vement supérieur à celui des patients inactifs et des contrôles (134 ± 63 vs 49 ± 26 et 64 ± 37 ; $p=0,003$ et $p=0,003$, respectivement). De plus, le pourcentage de cellules NK exprimant TLR9 est également augmenté chez les patients présentant un Lupus Systémique actif vs inactif et sujets contrôles ($32 \pm 17\%$ vs $13 \pm 15\%$ et $16 \pm 13\%$; $p=0,032$ et $p=0,046$, respectivement).

iii) Effet de l' Hydroxychloroquine sur l'expression de TLR9 *in vitro*

D'autre part, l'addition de HCQ à la culture de PBMCs de sujets contrôles stimulés par le CpG ODN 2216, un ligand de TLR9, inhibe clairement son effet activateur (*Figure 1B*). De ce fait, pour la suite de l'étude, seuls des patients atteints de Lupus Systémique ne recevant pas d'HCQ ont été testés.

3.3.1.2. Phénotype des cellules NK exprimant TLR9

Il existe une corrélation positive entre le niveau d'expression de TLR9 par les NK des patients atteints de Lupus Systémique et le niveau d'activation (CD69) de ces cellules ($R=0,68$; $p=0,0036$) (*Figure 1C*). L'analyse du phénotype des cellules NK TLR9⁺ indique que ces cellules ont un phénotype particulier en accord avec les anomalies antérieurement décrites. Les cellules NK exprimant TLR9 sont plus activées, comme en témoigne une forte expression du CD69, comparativement aux cellules NK TLR9⁻ ($88 \pm 26\%$ vs $31 \pm 19\%$; $p<0,001$). En revanche, les autres marqueurs étudiés (DNAM-1, NKG2A et CD16) ne semblent pas être significativement modifiés (*Figure 1D*).

3.3.2. Effet *in vitro* de différents stimuli sur l'activation et les fonctions des cellules NK (cultures de PBMCs)

L'objet de ces expériences suivantes avait pour objectif de vérifier si la voie TLR9 était fonctionnelle et impliquée dans l'activation des cellules NK au cours du Lupus Systémique.

3.3.2.1. Effet du CpG ODN 2216, un ligand synthétique de TLR9

i) Effet du CpG ODN 2216 sur l'activation des cellules NK

La stimulation overnight de PBMCs par du CpG ODN 2216 active les cellules NK des patients atteints de Lupus Systémique (actifs ou inactifs) et chez les contrôles (*Figure 2A*). Cela est attesté chez les patients par une augmentation significative du CD69 (de $30 \pm 18\%$ vs $65 \pm 19\%$; $p<0,001$). Il n'existe pas de corrélation entre le niveau d'expression de TLR9

et l'activation des cellules NK par le CpG ($R=-0,09$; $p=0,75$); de plus, la capacité d'activation des cellules NK par le CpG ODN 2216 est significativement diminuée pour les patients actifs comparativement aux inactifs (61 ± 16 vs 71 ± 14 ; $p=0,018$).

ii) Effet du CpG ODN 2216 sur les autres marqueurs phénotypiques des cellules NK

Par contre, la stimulation overnight par le CpG ODN 2216 ne modifie pas le niveau d'expression des différents marqueurs NK testés, incluant DNAM-1, CD16, NKG2A ou TLR9 (*résultats non montrés*).

iii) Effet du CpG ODN 2216 sur les fonctions des cellules NK

Un traitement overnight de PBMCs par le CpG ODN 2216 favorise également la dégranulation des cellules NK des contrôles et des patients en présence des cibles K562 (de 33 ± 11 % à 50 ± 17 % ; $p=0,0018$) (*Figure 2C*). Il est important de noter que le CpG ODN 2216 augmente également la production d'IFN γ par les cellules NK chez les patients (2 ± 2 % vs 5 ± 4 % ; $p<0,001$) et chez les contrôles (*Figure 2C*).

3.3.2.2. Evaluation de l'effet de l'IFN α -2a

Différentes données expérimentales visaient à évaluer l'effet *in vitro* de la cytokine clef du Lupus Systémique.

i) Effet de l'adjonction d'IFN α -2a aux cultures de PBMCs sur le phénotype, l'activation et les fonctions des cellules NK.

Afin d'évaluer indirectement l'impact de l'IFN α produit par les pDCs sur les modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK observées après la stimulation par le CpG ODN 2216, des cultures cellulaires en présence d'IFN α -2a ont été réalisées. L'augmentation de la proportion de cellules NK des patients et des contrôles exprimant CD69 après un traitement overnight par de l'IFN α -2a atteste de leur activation. Ces cellules ont également des capacités accrues à dégranuler par rapport aux cellules non-stimulées (33 ± 11 % vs 40 ± 18 % ; $p=0,0018$), (*Figure 2C*). Toutefois, la stimulation par de l'IFN α -2a est sans effet sur la production d'IFN γ par les cellules NK (2 ± 2 % à 3 ± 2 % ; $p=0,29$) (*Figure 2C*). Par ailleurs, le traitement overnight par de l'IFN α -2a aux concentrations testées n'induit pas l'expression de TLR9 par les cellules NK (intensité de fluorescence moyenne passant de 70 ± 49 à 57 ± 37 ; $p=0,999$).

ii) Corrélations entre les concentrations d'IFN α sériques l'expression de TLR9 sur les cellules NK

Il n'y a pas de corrélation entre les concentrations sériques d'IFN α des patients (n=15) et le niveau d'expression de TLR9 par les cellules NK (R=0,22, p=0,46).

iii) L'action du CpG ODN 2216 est indépendante du la production d'IFN α

Dans ces mêmes conditions de culture, il n'y a pas de synergie entre IFN α -2a et le CpG sur l'activation et la dégranulation des cellules NK ou leur capacité à produire de l'IFN γ (*Figure 3A*). De plus, des résultats préliminaires (n=3) suggèrent que la stimulation des PBMCs par le CpG ODN 2216 en présence d'anticorps anti-récepteur de l'IFN α entraîne une activation des cellules NK équivalente ou un peu plus faible que celle obtenue par le CpG ODN 2216 seul (*Figure 3B*).

3.3.2.3. Effet *in vitro* du CpG ODN 2216 sur des cellules NK triées

Afin de déterminer si un traitement par le CpG ODN 2216 agit directement sur les cellules NK ou indirectement via l'activation d'autres types cellulaires exprimant TLR9, des cultures overnight de cellules NK triées issus de patients et de contrôles ont été réalisées.

i) Effet de CpG ODN 2216 sur l'activation des cellules NK triées

En présence de CpG ODN 2216, une activation des cellules NK chez les sujets contrôles comme chez les patients est observée, le CD69 augmentant pour ces derniers de $23 \pm 15\%$ à $40 \pm 18\%$; p= 0,062 (*Wilcoxon test*) et p=0,0038 (*Paired T test*) (*Figure 2B*). Cette activation semble toutefois plus modérée que celle obtenue lors des cultures de PBMCs ($65 \pm 19\%$, p=0,04).

ii) Effet de CpG ODN 2216 sur les fonctions des cellules NK triées

En revanche, la dégranulation et la production d'IFN γ ne sont pas stimulées par le CpG de façon significative (*Figure 2B*) chez les patients ou les contrôles. Il semble d'autre part que le CpG ODN 2216 induit plus fortement la dégranulation des cellules NK des sujets contrôles que celle des patients (52 ± 10 vs 31 ± 19 ; p=0,044), suggérant peut-être un défaut particulier au cours du Lupus Systémique.

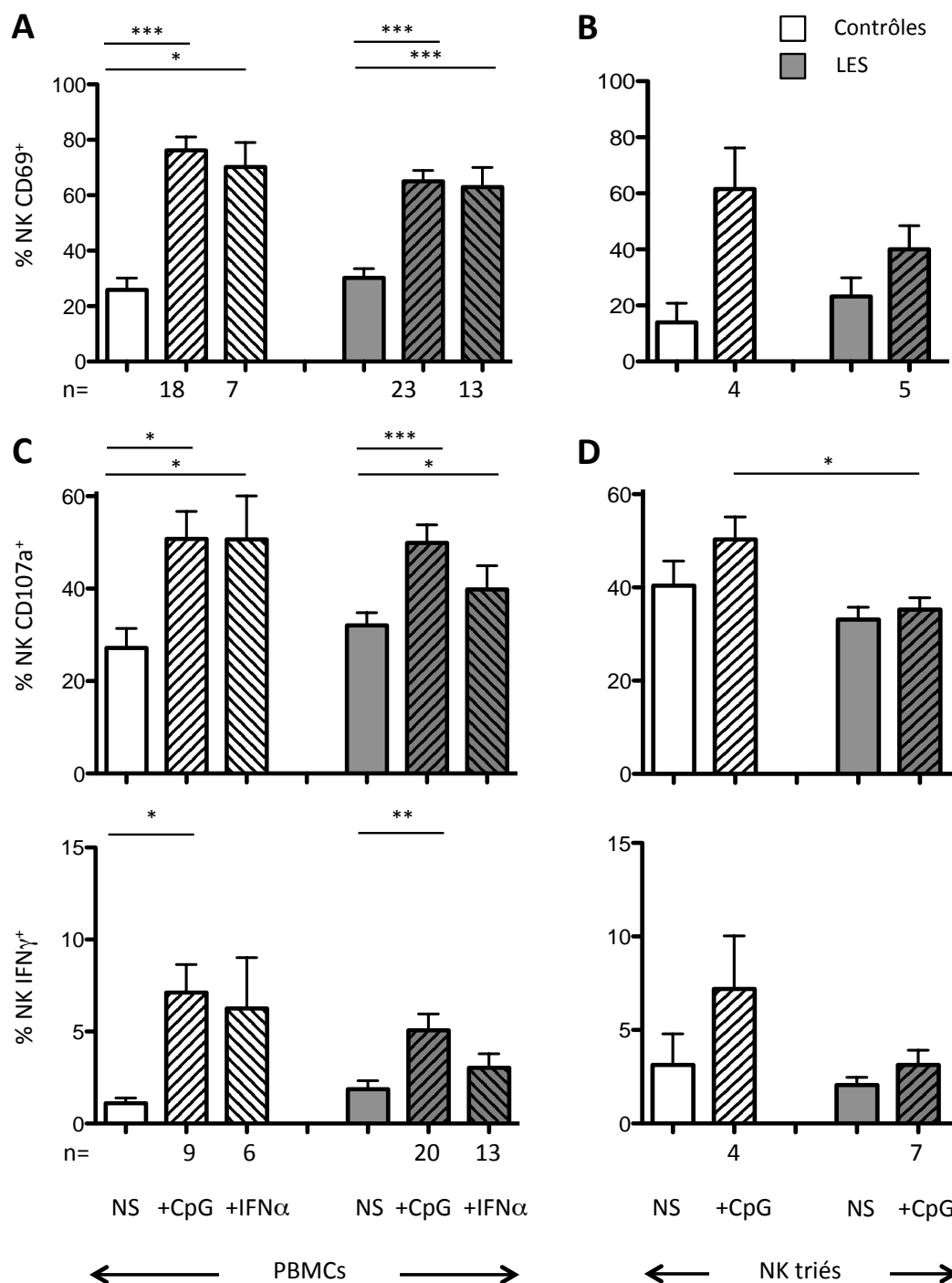


Figure 2 : Effets des stimulations par CpG ODN 2216 ou IFNα-2a sur l'activation et les fonctions des cellules NK.

A. Activation des cellules NK de sujets contrôles (blanc) et de patients atteints de Lupus Systémique (gris) par du CpG ODN 2216 (5 μM/mL) et de l'IFNα-2a (1500 UI/mL) sur des cultures de PBMCs ou **B.** sur des cultures de cellules NK triées. **C.** Fonctions des cellules NK : dégranulation (CD107a) et production intracellulaire d'IFNγ après stimulation par du CpG ODN 2216 et de l'IFNα-2a sur des cultures de PBMCs ou **D.** sur des cultures de cellules NK triées. NS : non stimulé. * : 0,01 < p ≤ 0,05 ; ** 0,01 < p ≤ 0,001 ; *** p < 0,001.

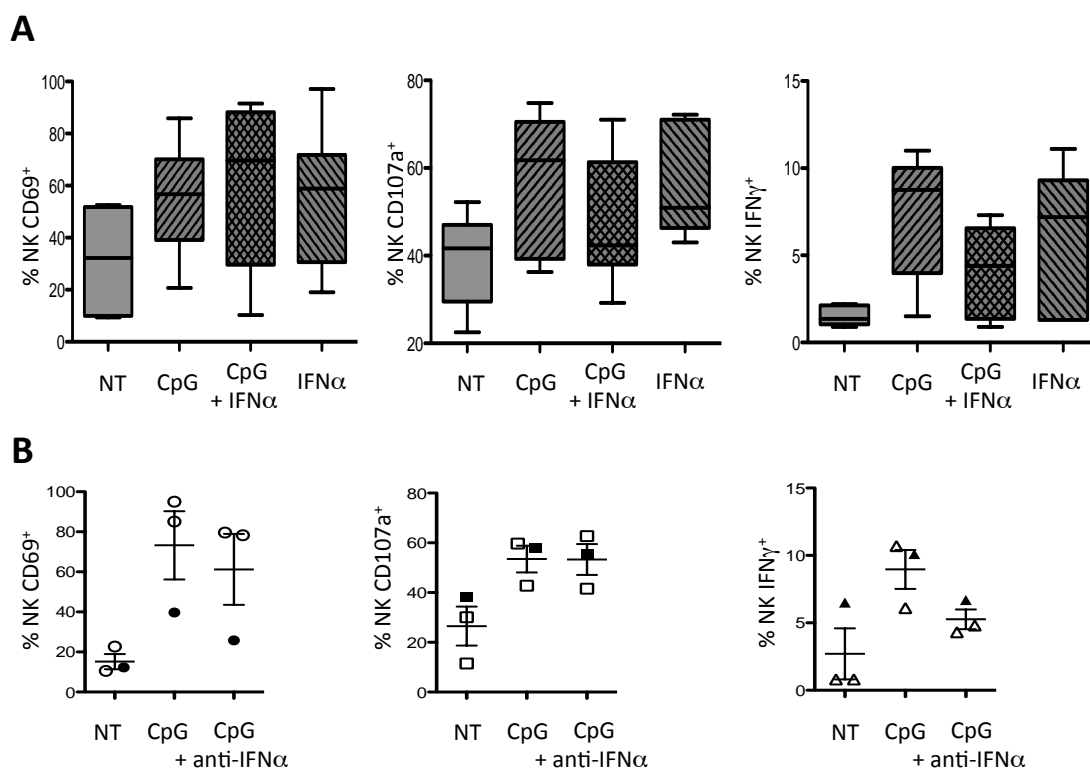


Figure 3 : Etude de la stimulation des cellules NK conjointement par CpG ODN 2216 et IFN α -2a et de l'effet des anticorps neutralisant anti-IFN α .

A Stimulation des PBMCs de patients atteints de Lupus Systémique (n=6) par du CpG ODN 2216 (5 μ M/mL), de l'IFN α -2a (1500 UI/mL) et du CpG ODN 2216 + de l'IFN α -2a : effet sur l'activation (CD69), la dégranulation (CD107a) et la production intracellulaire d'IFN γ des cellules NK. **B.** Effets du blocage du récepteur de l'IFN α (anticorps neutralisant anti-CD118 : 10 μ g/mL), sur la stimulation des cellules NK par le CpG ODN 2216 (cultures de PBMCs). NS : non stimulé.

3.3.3. Effet *in vitro* de stimuli impliqués dans la immunopathologie du Lupus sur l'activation des cellules NK

3.3.3.1. Effet des corps apoptotiques

Aucun effet sur l'activation (CD69) ou les fonctions des cellules NK (dégranulation et production de cytokines) n'a été observé lors des cultures de PBMCs de patients atteints de Lupus Systémique (n= 3) en présence de corps apoptotiques autologues overnight (*résultats non montrés*).

3.3.3.2. Effet de l'ADN circulant

i) Effet de l'ADN circulant de patients actifs sur des cellules NK hétérologues

Afin de mimer une situation proche de l'immunopathologie du Lupus Systémique, les PBMCs de patients (n=3) et de contrôles (n=3) ont été stimulées par de l'ADN circulant extrait du sérum de patients actifs (n=2), connu pour être augmenté et hypométhylé au cours du Lupus Systémique (*Isenberg D, 1994*). Aucune activation ou modulation des fonctions des cellules NK n'a été constatée (*Figure 4A*). L'addition de cathélicidine (LL-37), qui pourrait se lier aux ADN double brin au cours du Lupus Systémique et les rendre immunogènes en aidant à leur internalisation cellulaire (*Kahlenberg JM, 2013*), n'a pas d'effet sur le phénotype des cellules NK (incluant TLR9), l'activation et les fonctions des cellules NK des sujets contrôles ou des patients (*Figure 4A & résultats non montrés*).

ii) Effet de l'ADN circulant sur les cellules NK autologues

De même, l'ADN circulant testé en situation autologue pour 5 patients, ne semble pas non plus impliqué dans l'activation des cellules NK des patients (52 ± 10 vs 31 ± 18 ; $p=0,73$), dans la dégranulation ou la production d'IFN γ par ces cellules (*Figure 4B*). En présence d'immunoglobulines humaines polyvalentes, qui peuvent se lier au CD16a et donc permettre l'internalisation des ADN couplés à un anticorps spécifique, aucun effet significatif n'a été observé sur les différents paramètres étudiés (*Figure 4B*).

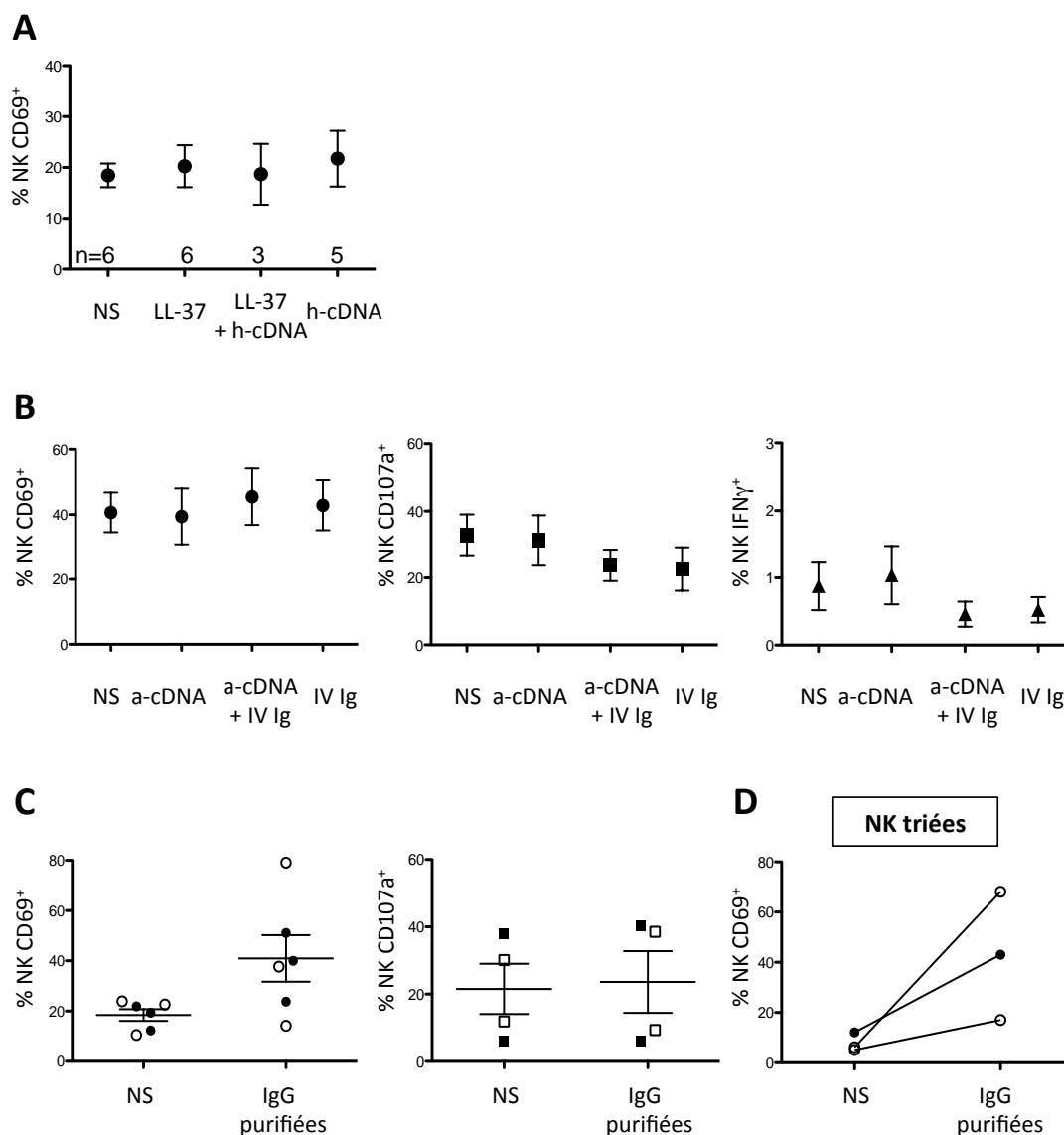


Figure 4 : Effets de différents auto-antigènes impliqués dans l'immunopathologie du Lupus Systémique sur l'activation et les fonctions des cellules NK.

A. Absence d'activation des cellules NK lors de la stimulation overnight de PBMCs par la cathélicidine (LL-37 : 1 μ g/mL), l'ADN circulant hétérologue (h-cDNA) isolé à partir du sérum de patients actifs (100 ng/mL) ou les deux. **B.** Absence d'activation des cellules NK et d'augmentation de leurs fonctions par la stimulation overnight de PBMCs de patients atteints de Lupus Systémique (n=5) par de l'ADN circulant autologue (a-cDNA : 100 ng/mL), des immunoglobulines polyvalentes (IV Ig : 1mg/mL) ou les deux. **C.** Activation mais absence d'augmentation de la dégranulation des cellules NK par stimulation overnight de PBMCs par des IgG purifiées à partir du sérum de patients actifs (n=2, 1 mg/ml). **D.** Activation des cellules NK triées par stimulation overnight par des IgG purifiées à partir du sérum de patients actifs (n=2, 1 mg/ml). Cercles ou carrés blancs = sujets contrôles, cercles ou carrés noirs = patients atteints de Lupus Systémique. NS : non stimulé.

3.3.3.3. Effet des anticorps anti-ADN double brin (cultures de PBMCs ou cellules NK triées)

Des études préliminaires ont été réalisées concernant la stimulation des PBMCs de sujets contrôles (n=3) ou de patients (n=3) par les IgG purifiées à partir du sérum de deux patients LES actifs contenant des anticorps spécifiques anti-ADN double brin (Tests de Farr > 100 UI). Les données indiquent que par rapport à des IgG provenant de donneurs sains, ceux des patients activent plus significativement les cellules NK ; la proportion des cellules CD69⁺ passant $18 \pm 6\%$ vs $41 \pm 23\%$ (p=0,031). (*Figure 4C*). Il est important de noter qu'étant également observé avec des cellules NK triées (*Figure 4D*), cet effet semble direct. Par contre, un traitement par des IgG polyvalentes issus de donneurs sains n'a pas d'effet sur capacités fonctionnelles des cellules NK.

3.4. Discussion

3.4.1. Implication de la voie TLR9 sur les cellules NK au cours du Lupus Systémique

Cette étude confirme l'implication de la voie du TLR9 au cours du Lupus Systémique et plus particulièrement au niveau de l'activation des cellules NK. Comme cela a été documenté au niveau des PBMCs (**Mu R, 2012**) ou plus spécifiquement pour des pDCs ou des lymphocytes B (**Nakano S, 2008 & Papadimitraki ED, 2006**), une augmentation de l'expression de TLR9 au niveau des cellules NK au cours du LES a été mise en évidence. Celle-ci corrèle avec l'activité de la maladie. De plus, les cellules NK qui expriment TLR9 sont plus fortement activées, comme en témoigne l'expression du CD69, en accord avec l'étude précédente (*Résultats 1*). L'HCQ est connue pour inhiber la voie TLR9 par inhibition de l'acidification des vésicules endosomales (**Yi AK, 1998**) dans lesquelles a lieu la rencontre de TLR9 avec ses ligands. Cette drogue est reconnue pour son efficacité en traitement au long cours des patients atteints de Lupus Systémique. Comme cela a été rapporté pour les pDCs (**Sacré K, 2012**), l'effet inhibiteur de l'HCQ constaté *in vitro* sur l'activation des cellules NK par la voie TLR9 confirme indirectement l'implication spécifique de cette dernière. Le mécanisme impliqué dans ce processus n'est cependant pas complètement élucidé. L'expression de TLR9 n'est pas inductible par son ligand synthétique le CpG ODN 2216 ou après traitement par de l'IFN α -2a, la cytokine clef de la maladie, et des investigations complémentaires sont donc nécessaires. Il serait par exemple intéressant d'étudier l'action des nucléosomes, qui représentent des auto-antigènes majeurs du Lupus Systémique, sur l'expression de TLR9 par les cellules NK, comme cela a été montré sur les polynucléaires neutrophiles (**Lindau D, 2011**).

Il n'existe pas de corrélation stricte entre le niveau d'expression de TLR9 par les cellules NK et la capacité de ces dernières à s'activer ou à augmenter leurs fonctionnalités (*résultat non montré*) lorsque les PBMCs sont stimulées par le CpG ODN 2216. Au contraire, les cellules NK des patients actifs, déjà majoritairement activées, répondent moins bien à cette stimulation comparativement à celles des patients inactifs ou des contrôles. Cela suggère que le mode d'activation des cellules NK par la voie TLR9 n'est pas que de la présence du CpG ODN 2216, mais répond probablement à des mécanismes plus complexes. Il pourrait exister une « compétition » entre le CpG, utilisé *in vitro*, et les auto-antigènes du Lupus Systémique ou encore d'une désensibilisation des cellules NK du fait de la présence prolongée et en grande quantité des auto-antigènes chez les patients actifs (**Pradeu T, 2013**). D'autre part, des messagers chimiques tels que des cytokines, voire d'autres molécules ou récepteurs comme HMGB1, RAGE ou les FcRs, qui sont nécessaires à l'action d'autres ligands de TLR9 pourraient également intervenir dans l'activation cellulaire. De plus, il est intéressant de noter que *Sivori et coll.* ont rapporté sur les cellules NK qu'il existait une co-internalisation du CpG ODN et de KIR3DL2 dans les endosomes précoces (**Sivori S, 2010**). Des interactions cellulaires peuvent également être envisagées, comme celles montrées entre des pDCs et des cellules NK (**Hagberg N, 2011**). D'ailleurs, il est important de noter que les différences de résultats obtenus à partir des PBMCs et des NK triés, renseignent sur l'éventualité de telles interactions.

3.4.2. L'implication de la voie TLR9 ne semble pas dépendante de l'IFN α mais dépendante d'autres messages cellulaires

La stimulation des PBMCs par de l'IFN α -2a n'est pas strictement superposable à celle obtenue par le CpG ODN 2216, notamment en matière de production d'IFN γ par les cellules NK, qui est significativement plus marquée avec le CpG ODN 2216. Ce résultat corrobore les données observées avec des PBMCs, hors contexte de Lupus Systémique (**Marshall JD, 2006**) ou des cellules NK triées en présence d'IL12 et/ou d'IL8 (**Sivori S, 2004**). De plus, le CpG et l'IFN α -2a ne semblent pas agir en synergie pour induire l'activation et l'augmentation des fonctions des cellules NK. Enfin, des données préliminaires réalisées en présence d'anticorps dirigés contre la chaîne 2 du récepteur des IFNs de type 1 suggère que l'activation des cellules NK en présence de CpG ODN 2216 n'est pas seulement dépendante de l'induction d'IFN α , qui est notamment produit par les pDCs au cours du Lupus Systémique.

L'ensemble de ces résultats permet de faire plusieurs hypothèses sur le mode d'activation des NK par le CpG ODN 2216 : (i) une action directe sur les cellules NK via le TLR9 ou (ii) par l'implication d'autres types cellulaires comme les sous-types de lymphocytes B ou les pDCs. Le

rôle du CpG ODN 2216 dans l'activation des cellules NK, a été appréhendé après tri cellulaire. Les données indiquent que la stimulation par le CpG ODN 2216 de cellules NK purifiées entraîne leur activation, comme en témoigne l'augmentation du CD69 chez les sujets contrôles et les patients. Ceci est néanmoins insuffisant pour stimuler leurs fonctions de dégranulation ou de production de cytokines, comme l'IFN γ . Autrement dit, si la liaison de TLR9 avec le CpG ODN 2216 est suffisante pour induire directement l'activation des cellules NK, leurs fonctionnalités est dépendante de signaux complémentaires, qui devront être déterminés.

Parmi les candidats possibles, il est vraisemblable que les pDCs et les lymphocytes B soient mises en jeu, ces cellules étant déjà impliquées dans la pathogénie du Lupus Systémique (**Mathian A, 2013**). Il a récemment été montré que les pDCs interagissent avec les cellules NK (CD56^{dim} notamment) au cours du Lupus Systémique (**Hagberg N, 2011 & 2013**) : ces dernières sont alors capables d'activer les pDCs et de favoriser leur production d'IFN α par des mécanismes mettant en jeu MIP-1 β , et des contacts cellules-cellules, par l'intermédiaire de LFA-1, CD229 (LY-9) et CD319 (CRACC). Ces différentes interactions qui n'ont pour le moment pas encore été étudiées ici pourraient induire l'activation des cellules NK par les pDCs et aboutir, comme constaté par les auteurs, à la production d'IFN γ par les cellules NK. En plus de l'IFN α , les pDCs sont capables de produire de l'IL12 et de l'IL8, dont le rôle synergique dans la production d'IFN γ par les cellules NK stimulées par le CpG est établi (**Sivori S, 2004**).

Bien que moins documentées, les interactions entre lymphocytes B et cellules NK devront être envisagées au cours du Lupus Systémique. En dehors de tout contexte auto-immun, il a été rapporté une capacité des lymphocytes B à promouvoir la production d'IFN γ par les cellules NK, selon des mécanismes dépendant de contacts cellulaires (**Yuan D, 2004**). De plus les lymphocytes B sont fortement impliqués au cours du Lupus Systémique, comme cellules présentatrices d'antigènes et productrices d'auto-anticorps. Ainsi, l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes via des voies impliquant TLR9 ont déjà été démontrées (**Leadbetter EA, 2002 & Capolunghi F, 2008**).

Afin de déterminer la nature des différentes interactions chez les patients atteints de Lupus Systémique, différentes expériences devraient être envisagées, comme des stimulations de PBMCs déplétées des pDCs ou des lymphocytes B en présence de CpG ODN 2216. De plus, des études immuno-histochimiques, notamment dans des tissus cibles affectés au cours du Lupus Systémique comme la peau ou les reins, pourraient permettre de vérifier la co-localisation de ces différents protagonistes, par l'utilisation de marqueurs spécifiques des cellules NK (anti-NKp46, R&D System®), des pDCs (anti-BCDA-2, Miltenyi Biotec®) et des lymphocytes B (anti-CD19, Dako®).

3.4.3. Les auto-anticorps du Lupus Systémique semblent capables d'activer directement la voie TLR9 des cellules NK.

Cette étude a également permis d'évaluer l'implication de différents auto-antigènes du Lupus Systémique, ligands de TLR9, dans l'activation des cellules NK. Parmi ceux-ci (à l'exception des nucléosomes qui n'ont pas été testés), seuls les auto-anticorps sous formes de complexes immuns sont capables d'activer les cellules NK. Les études à partir de PBMCs ou de cellules NK triés, suggèrent fortement que l'action de ces auto-anticorps est directe. Ces résultats suggèrent une implication du CD16a. Celle-ci peut être directe ou s'effectuer via l'internalisation des auto-anticorps, de façon similaire à l'action du CD32 pour les pDCs : ceci pourrait permettre aux auto-antigènes contenus dans ces complexes immuns de se lier au TLR9 endosomal. Bien que vraisemblables, ces mécanismes devront toutefois être démontrés en utilisant des anticorps anti-CD16 bloquants (clone CG8, Bekman-Coulter®), comme cela a été réalisé lors de la stimulation des cellules NK avec des auto-anticorps liant le TLR7 (*Hagberg N, 2011*) et des inhibiteurs de TLR9 (CpG ODN TTAGGG ou l'HCQ), afin de s'assurer que ce récepteur est bien impliqué dans la transduction du signal délivré par les complexes immuns contenant des ADN double brin. Les données présentées ici suggèrent que les auto-anticorps n'ont pas d'effet sur les fonctions des cellules NK. Si cela était confirmé sur un plus large effectif, il faudrait en conclure que le signal délivré est différent, moins puissant ou de cinétique moins rapide que le CpG ODN 2216 lui-même.

3.4.4. La voie TLR9 des cellules NK pourrait être anormale au cours du Lupus Systémique

Enfin, contrairement à d'autres études qui ont mis en évidence des différences fonctionnelles entre les cellules NK des patients atteints de Lupus Systémique et les sujets contrôles (*Hagberg N, 2011*), il est important de noter que la seule différence qui a pu être identifiée au cours de cette étude est une plus grande capacité pour les cellules NK des contrôles à dégranuler lorsqu'elles sont triées et stimulées par le CpG ODN 2216. Si ce résultat était confirmé sur une plus grande cohorte de patients, il pourrait signifier que les cellules NK des patients ont un défaut intrinsèque ou acquis dans la voie du TLR9. L'existence de polymorphismes particuliers du TLR9 ou d'autres molécules impliquées dans cette voie d'activation devra alors être envisagée, comme cela a été antérieurement suggéré (*Laska MJ, 2014, Zhang J, 2014, Li J 2012*).

3.5. Conclusions

Ce travail a permis de montrer que les cellules NK sont impliquées dans la physiopathologie du Lupus Systémique. Elles sont bien activées et sur-expriment TLR9. Elles sont activables par du CpG ODN 2216, un ligand de TLR9, au même titre que les cellules NK des sujets contrôles. Cette activation passe directement par la cellule NK mais le niveau obtenu n'est pas suffisant pour les rendre plus fonctionnelles, suggérant une possible implication d'autres cellules du système immunitaire dans la boucle d'activation. De plus, l'absence de stimulation des cellules NK par les auto-antigènes du Lupus Systémique, à l'exception des complexes immuns, suggérerait une implication du CD16a présent à la surface des cellules NK.

3.6. Références

Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med.* 2007 May;13(5):543-51. Review. PubMed PMID: 17479100.

Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, Seganti G, Zuntini R, Ferrari S, Cagliuso M, Quinti I, Carsetti R. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol.* 2008 Jan 15;180(2):800-8. PubMed PMID: 18178818.

Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Hulot JS, Aymard G, Leroux G, Marra D, Lechat P, Piette JC. Very low blood hydroxychloroquine concentration as an objective marker of poor adherence to treatment of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jun;66(6):821-4. Epub 2007 Feb 26. PubMed PMID: 17324970.

Hagberg N, Theorell J, Schlums H, Eloranta ML, Bryceson YT, Rönnblom L. Systemic lupus erythematosus immune complexes increase the expression of SLAM family members CD319 (CRACC) and CD229 (LY-9) on plasmacytoid dendritic cells and CD319 on CD56(dim) NK cells. *J Immunol.* 2013 Sep 15;191(6):2989-98. PubMed PMID: 23956418.

Hagberg N, Berggren O, Leonard D, Weber G, Bryceson YT, Alm GV, Eloranta ML, Rönnblom L. IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1 β and LFA-1. *J Immunol.* 2011 May 1;186(9):5085-94. PubMed PMID: 21430220.

Harigai M, Kawamoto M, Hara M, Kubota T, Kamatani N, Miyasaka N. Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J Immunol.* 2008 Aug 1;181(3):2211-9. PubMed PMID: 18641361.

Isenberg DA, Ehrenstein MR, Longhurst C, Kalsi JK. The origin, sequence, structure, and consequences of developing anti-DNA antibodies. A human perspective. *Arthritis Rheum.* 1994 Feb;37(2):169-80. Review. PubMed PMID: 7510484.

Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and auto-immune disease. *J Immunol.* 2013 Nov 15;191(10):4895-901. Review. PubMed PMID: 24185823.

Laska MJ, Trolldborg A, Hansen B, Stengaard-Pedersen K, Junker P, Nexø BA, Voss A. Polymorphisms within Toll-like receptors are associated with systemic lupus erythematosus in a cohort of Danish females. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Jan;53(1):48-55. PubMed PMID: 24064706.

Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*. 2002 Apr 11;416(6881):603-7. PubMed PMID: 11948342.

Li J, Tao JH, Gao W, Fan Y, Lu MM, Li R, Li XP, Ye DQ. Lack of association of Toll-like receptor 9 polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in an Asian population: a meta-analysis. *Mod Rheumatol*. 2012 Aug;22(4):550-6. Erratum in: *Mod Rheumatol*. 2012 Aug;22(4):557. PubMed PMID: 22228476.

Lindau D, Rönnefarth V, Erbacher A, Rammensee HG, Decker P. Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol*. 2011 Mar;41(3):669-81. doi: 10.1002/eji.201040593. Epub 2011 Feb 1. PubMed PMID: 21287547.

Marshall JD, Heeke DS, Abbate C, Yee P, Van Nest G. Induction of interferon-gamma from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon-alpha and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology*. 2006 Jan;117(1):38-46. PubMed PMID: 16423039.

Mathian A, Arnaud L, Amoura Z. [Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: A 2014 update.]. *Rev Med Interne*. 2013 Nov 18. pii: S0248-8663(13)01055-2. doi: 10.1016/j.revmed.2013.10.334. [Epub ahead of print] French. PubMed PMID: 24262408.

Mu R, Sun XY, Lim LT, Xu CH, Dai CX, Su Y, Jia RL, Li ZG. Toll-like receptor 9 is correlated to disease activity in Chinese systemic lupus erythematosus population. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Aug;125(16):2873-7. PubMed PMID: 22932083.

Nakano S, Morimoto S, Suzuki J, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, Takasaki Y. Role of pathogenic auto-antibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Feb;47(2):145-9. Epub 2007 Dec 26. PubMed PMID: 18160420.

Papadimitraki ED, Choulaki C, Koutala E, Bertsias G, Tsatsanis C, Gergianaki I, Raptopoulou A, Kritikos HD, Mamalaki C, Sidiropoulos P, Boumpas DT. Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the auto-immune process. *Arthritis Rheum*. 2006 Nov;54(11):3601-11. PubMed PMID: 17075805.

Park YW, Kee SJ, Cho YN, Lee EH, Lee HY, Kim EM, Shin MH, Park JJ, Kim TJ, Lee SS, Yoo DH, Kang HS. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009 Jun;60(6):1753-63. doi: 10.1002/art.24556. PubMed PMID: 19479851.

Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O, Sturfelt G, Ramsey-Goldman R, Bae SC, Hanly JG, Sánchez-Guerrero J, Clarke A, Aranow C, Manzi S, Urowitz M, Gladman D, Kalunian K, Costner M, Werth VP, Zoma A, Bernatsky S, Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Jacobsen S, Buyon JP, Maddison P, Dooley MA, van Vollenhoven RF, Ginzler E, Stoll T, Peschken C, Jorizzo JL, Callen JP, Lim SS, Fessler BJ, Inanc M, Kamen DL, Rahman A, Steinsson K, Franks AG Jr, Sigler L, Hameed S, Fang H, Pham N, Brey R, Weisman MH, McGwin G Jr, Magder LS. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012 Aug;64(8):2677-86. PubMed PMID: 22553077.

Pradeu T, Jaeger S, Vivier E. The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? *Nat Rev Immunol*. 2013 Oct;13(10):764-9. doi: 10.1038/nri3521. Epub 2013 Sep 2. PubMed PMID: 23995627.

Rönnblom L. The type I interferon system in the etiopathogenesis of auto-immune diseases. *Ups J Med Sci*. 2011 Nov;116(4):227-37. Review. PubMed PMID: 22066971.

Sacre K, Criswell LA, McCune JM. Hydroxychloroquine is associated with impaired interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha production by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2012 Jun 27;14(3):R155. doi: 10.1186/ar3895. PubMed PMID: 22734582.

Sivori S, Falco M, Carlomagno S, Romeo E, Soldani C, Bensussan A, Viola A, Moretta L, Moretta A. A novel KIR-associated function: evidence that CpG DNA uptake and shuttling to early endosomes is mediated by KIR3DL2. *Blood*. 2010 Sep 9;116(10):1637-47. PubMed PMID: 20147700.

Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L, Moretta A. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 6;101(27):10116-21. Epub 2004 Jun 24. PubMed PMID: 15218108.

Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol*. 1998 May 15;160(10):4755-61. PubMed PMID: 9590221.

Yuan D. Interactions between NK cells and B lymphocytes. *Adv Immunol*. 2004;84:1-42. Review. PubMed PMID: 15246249.

Zhang J, Zhu Q, Meng F, Lei H, Zhao Y. Association study of TLR-9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus in northern Chinese Han population. *Gene*. 2014 Jan 1;533(1):385-8. Epub 2013 Sep 1. PubMed PMID: 24004541.

4. Etude descriptive des cellules NK au cours du Syndrome des Antisynthétases

4.1 Introduction

Le rôle des cellules NK au cours de certaines myopathies inflammatoires a fait l'objet de recherches complémentaires. L'objectif principal de ce travail était de réaliser une étude phénotypique et fonctionnelle des cellules NK, similaire à celle réalisée chez des patients atteints de Lupus Systémique, afin de rechercher si différents mécanismes impliquant les cellules NK étaient mis en jeu dans différentes maladies auto-immunes systémiques. Il s'agissait notamment d'évaluer le lien joué dans ce contexte par l'IFN α , une cytokine qui d'après les données de la littérature pourrait également être impliquée dans la physiopathologie de ces maladies [224] comme au cours du Lupus Systémique.

L'autre intérêt majeur de cette étude est de pouvoir avoir accès aux tissus cibles (biopsies musculaires et pulmonaires notamment) afin d'obtenir des informations sur les cellules NK au delà du simple compartiment sanguin périphérique.

Le manuscrit qui suit est une version proposée aux co-auteurs pour relecture en vue d'une soumission prochaine.

Evidence for the involvement of NK cells in Antisynthetase Syndrome.

B. Hervier^{1,2}, Y. Allenbach^{2,3,4}, M. Perez⁵, H. Devilliers^{6,7}, F. Cohen-Aubart⁸, Y. Uzunhan⁹, JF. Méritet¹⁰, A. Achour¹, E. Longchamp¹¹, Z. Amoura^{1,8}, W. Stenzel⁴, I. Cremer⁵, O. Benveniste^{2,3}, V. Vieillard¹.

Abstract

Background: Antisynthetase syndrome (aSS) is characterized by the association of interstitial lung disease and myositis with anti-tRNA-synthetase autoantibodies. Its pathogenesis remains unknown, especially regarding the involvement of innate immune cells, including natural killer (NK) cells. Here, we describe the first phenotypic and functional characterization of NK cells in this context.

Methods: A total of 20 patients with inactive and active aSS were included (women/men =9, median age =50 years), and compared to 20 healthy controls. Freshly isolated NK cell phenotype was performed by Flow cytometry. Polyfunctionality assays were performed to measure degranulation and intracellular production of TNF α and IFN γ , spontaneously or after stimulation by interleukin(IL)-12 and IL18, in the presence of K562 target cells. The presence and the localization of NK cells in primary human specimens of lung (n=3) and muscle (n=3) target tissue were studied by immunohistochemistry, using anti-NKp46 monoclonal antibody.

Results: NK cells from inactive patients showed normal phenotype, whereas active aSS revealed a differentiated NK cell profile, as indicated by a increased level of CD57 (p=0.09) and ILT2 (p=0.016) associated with decreased CD161 (p=0.052) and NKp30 (p=0.009), compared to healthy donors. This is consistent with the inability of circulating NK cells of active aSS patients to produce IFN γ (p=0.0017) after IL12 plus IL18 stimulation, compared to healthy controls. More importantly, our in-depth analysis reveals that NKp30 down-modulation strongly correlated with the loss of NK cell functions (Spearman coefficient r=0.57, p=0.009), and could be a surrogate marker of aSS activity. Histological studies reveal for the first time the presence of small numbers of NK cells in the muscles, as well as a massive infiltration of NK cells inside the lungs of aSS patients.

Conclusions: Taken as a whole, NK cell phenotypic and polyfunctional changes as well as infiltration of target tissue argue for an involvement of NK cells in aSS pathogenesis.

Author's Affiliations

1. INSERM & UPMC, CIMI 1135, Paris, F-75013, France
2. APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Médecine Interne & Immunologie Clinique, Centre National de Référence des Maladies Musculaires, Paris, F-75013, France
3. INSERM UMR-S 974 & UPMC, Paris, F-75013, France
4. Department of Neuropathologie, Charité – Universitätsmedizin, Berlin, Germany.
5. INSERM UMR-S 1138 & UPMC, Paris, F-75013, France
6. Centre Hospitalier Universitaire, Département de Médecine Interne et Maladies Systémiques
7. Centre d'investigations cliniques, INSERM CIE1, Dijon, F-21000, France
8. APHP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Service de Médecine Interne 2, Centre National de Référence des Maladies auto-immune et systémiques rares, Paris, F-75013, France
9. University Paris 13, Sorbonne Paris Cité, EA 2363; AP-HP, Département de Pneumologie, Hôpital Avicenne, Bobigny 93000, France
10. APHP, Hôpital Cochin-La roche Guyon, Laboratoire de Virologie, Paris, F-75014, France
11. Département d'Anatomopathologie, Foch Hospital, Suresnes, F-92073, France

Corresponding author:

Dr Baptiste Hervier, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 47-83 boulevard de L'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France; phone: +33 1 42 17 80 21; fax: + 33 1 42 17 82 41, email: baptiste.hervier@psl.aphp.fr

Antisynthetase syndrome (aSS) is an auto-immune connective tissue disease characterized by the presence of autoantibodies directed against different aminoacyl- tRNA-synthetases, of which hystidyl tRNA-synthetase is the most common autoantigenic target (*Hervier B, 2013*). Though some clinical differences based on the anti-ARS specificity have been reported (*Hervier B, 2012; Aggarwal R, 2014*), the aSS spectrum mainly consists of interstitial lung disease (ILD), inflammatory myopathy and polyarthritis with fever, Raynaud's phenomenon and mechanic's hands (*Hervier B, 2013*). The prognosis of aSS is closely linked to the ILD, which can progress to severe lung fibrosis even with the use of immunosuppressive drugs (*Stanciu R, 2012*). Though aSS pathogenesis remains largely unknown, there is increasing evidence for an

involvement of both innate and adaptive immune cells: the disease could start in the lungs, where the histidyl-tRNA synthetase is expressed in a specific structural conformation (Levine SM, 2007). Under the influence of proteolytic enzymes, including Granzyme-B, the tRNA-synthetase is cleaved and becomes immunogenic (Howard O, 2002). Mice models have recently demonstrated that a peptide from the histidyl-tRNA synthetase induces the activation of innate immune cells such as monocytes, through the signaling pathways of both Toll-like receptors (TLR) TLR-2 and TLR-4 (Fernandez I, 2013). Furthermore, these histidyl-tRNA synthetase peptides act as chemo-attractants, inducing the migration of immune cells (T lymphocytes and immature dendritic cells) into the lung as well as the production of specific autoantibodies (Howard O, 2002). In addition to these immune mechanisms, the activation and survival of B cells has been demonstrated and is associated with the production of both IFN α and the B cell-activating factor BLyS (Eloranta ML, 2007; Krystufková O, 2009). To date, however, the specific contribution of natural killer (NK) cells to the aSS pathogenesis has not been studied, though they have been shown to be involved in several other autoimmune diseases (Fogel LA, 2013), including systemic lupus erythematosus (Hervier B, 2011) and Sjögren's syndrome (Rusakiewicz S, 2013).

It has generally been assumed that NK cells provide surveillance in the early defense against viruses, intracellular bacteria and tumor cells (Vivier E, 2011). In addition to producing a cytotoxic environment directed against certain target cells, they also regulate the function of other cells by secretion of cytokines and chemokines (Vivier E, 2011). Heterogeneous subsets of NK cells differ in their proliferative potential, homing characteristics, functional properties and responses to different cytokines. They can be divided into two major subsets, based on the density of CD56 cell-surface expression. Despite evidence that the progression from CD56^{bright} to CD56^{dim} NK cells is likely to be part of some continuum in their development, it also seems likely that both subsets play relatively distinct and important roles in the immune response (Cooper MA,

2001). Up to 90% of CD56^{dim} cells are present in the periphery, which produces relatively low levels of cytokine but can spontaneously lyse susceptible target cells, through the perforine/granzyme signaling pathways. Conversely, less than 10% of NK cells in the blood are CD56^{bright}. Within minutes of activation, CD56^{bright} NK cells can produce a wide range of cytokines (e.g. IFN- γ , TNF- β , and Interleukin (IL)-10) and chemokines (e.g. MIP-1 α and RANTES), but their ability to kill target cells spontaneously is weak.

The activity of NK cells is controlled by a dynamic signal balance between a vast network of activating and inhibitory receptors, which are triggered upon interaction with their cognate ligands to detect their cellular targets while sparing normal cells (Vivier E, 2011). Under normal circumstances NK cells express inhibitory receptors, such as Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR), immunoglobulin-like transcript 2 (ILT2/CD85j), and CD94/NKG2A heterodimeric receptors, which all recognize self molecules of the HLA class I repertoire, constitutively expressed on host cells. Moreover, a critical threshold of signaling via activating receptors that exceeds the counterbalancing influence of inhibitory receptors must be reached in order for NK cells to mount a productive response. These activating receptors include NKG2D, FC γ RIIIA (CD16a) and the natural cytotoxic receptors NKp46 (NCR1) and NKp30 (NCR3).

The aim of this study is to provide the first extensive phenotypic and functional characterization of NK cells in patients with aSS. We therefore focused our study on circulating NK cells from the peripheral blood as well as NK cell infiltrates within the lung and muscle target tissue, in order to establish their involvement in the aSS pathogenesis.

Patients and Methods

Patients and controls

Twenty patients from Internal Medicine Departments 1 & 2, of the French referral centers for Neuromuscular disorders and Systemic Lupus Erythematosus, La Pitié-Salpêtrière, Paris, were included between June 2012 and February 2014. This

study was approved by the hospital ethics committee (CPP-IDF-VI, June 26th 2012) and in accordance with French law, anonymously reported patients gave their consent.

All patients were diagnosed with aSS based on the association of clinical manifestations: myositis (n=18), ILD (n=18) and/or Rheumatic symptoms (n=10) and serologic features (two successive positive tests for ARS, including Luminex-100 system (Luminex, Austin, TX, USA), and IMMUNO-DOT (Euroimmun AG, Lübeck Germany). Patients (2 men/18 women, median age of 50 years, range 19-77) were divided into two groups (Table 1), based on their disease activity: i) Active myositis (myalgia or muscle weakness as attested by a Medical Research Council with a sum score ≤ 4 for at least 1 muscle group evaluated by manual muscle testing, with elevated creatine-kinase level \geq two times the normal range), ii) arthritis (slight pain and swollen joints) leading to disease-modifying anti-rheumatic drug use and/or iii) appearance or deterioration of ILD ($> 10\%$ decrease in lung vital capacity or $> 15\%$ decrease in diffusion capacity of lungs for carbon monoxide as compared to previous pulmonary function tests). At inclusion, specific treatments of aSS (including steroids, hydroxychloroquine and/or immunosuppressive drugs) were as low as possible and prescribed at a stable dose for a minimum of at least 1 month. Of note and as shown in Table 1, there were neither demographic (median age 54 vs. 47, $p=0.52$) nor therapeutic differences between active (n=10) and inactive (n=10) aSS patients (the number of steroid-free patients was similar in both groups: 2/10 vs. 4/10, $p=0.63$ as was the median dose of steroids: 5 vs 8.5 mg/day, $p=0.73$). NK cell quantitative and phenotyping analyses of patients with aSS were compared to 20 anonymous healthy controls from the Etablissement Français du Sang (between 18-65 years old), whereas NK cell functional analyses as well as serum cytokine measurements were compared to 10 other healthy controls (median age 31, range 22-58). The age of the patients with active aSS was not significantly different from that of these controls (31 vs. 47, $p=0.19$).

Flow cytometry analyses

Nine-color flow cytometry analyses were performed on freshly isolated blood cells. NK cells were analysed after staining with the appropriate antibodies the following antigens: CD8 α (B9.11), CD16 (3G8), CD56 (N901), CD57 (NC-1), CD69 (TP1.55.3), CD159a/NKG2A (Z199), NKG2D (ON72), ILT-2/CD85j (HP-F1) from Beckman-Coulter, CD3 (UCHT1; eBioscience), NKG2C (134591; R&D Systems), anti-CD337/NKp30 (AF29-4D12) from Miltenyi Biotech. FACS lysing solution (Becton Dickinson) was used to lyse erythrocytes. At least 20,000 lymphocytes were

Table 1: Patient characteristics and treatments

(y): year, ARS: Anti-tRNA-synthetase antibody; Ab: Antibodies; (15): daily dose of steroids (mg), M: Myositis, ILD: Interstitial Lung Disease, na: not measurable, nd: not determined, MMF: Mycophenolate Mophetil; AZA: Azathioprine, MTX: Methotrexate, HCQ: Hydroxychloroquine, IV Ig: Intra-Venous Immunoglobulins.

Patient	Age at onset (y)	Gender	Disease duration (y)	ARS	Other Auto-Ab	Disease Activity	Treatments
1	51	W	2	Jo-1		No	MMF, Steroids (15)
2	57	W	4	Jo-1	Sm	No	AZA, Steroids (5)
3	57	W	22	Jo-1		No	MTX, Steroids (5)
4	44	W	5	Jo-1		No	HCQ
5	67	W	4	PL12	Ro/SSA-52	No	MTX, IV Ig, Steroids (5)
6	41	W	8	Jo-1		No	HCQ, MMF, Steroids (15)
7	45	W	6	PL12	Ro/SSA-52	No	MMF, Steroids (5)
8	67	W	22	PL12	nd	No	Steroids (10)
9	77	M	11	Jo-1		No	None
10	29	W	6		Ro-SSA-60, La/SSB	No	Steroids (5)
11	42	W	4	PL7	Ro/SSA-60	Yes, M	HCQ, Steroids (10)
12	48	W	3	Jo-1	Ro/SSA-52	Yes, ILD	MMF, Steroids (10)
13	60	W	5	Jo-1	Ro/SSA-52	Yes, M	Steroids (20)
14	46	W	0	Jo-1		Yes, M	None
15	19	W	1	PL12		Yes, M	None
16	37	W	2	Jo-1	Ro/SSA-52	Yes, M	MMF, Steroids (15)
17	25	W	1	PL12	Ro/SSA-52	Yes, M & ILD	None
18	53	W	1	PL7	Ro/SSA-52	Yes M & Arthritis	Steroids (20)
19	72	M	5	Jo-1	Ro/SSA-52	Yes, M	MMF, Steroids (7)
20	72	W	3	PL7	Ro/SSA-52	Yes, M	None

analyzed on a Gallios instrument (Beckman Coulter). Flow cytometry data was analyzed using FlowJo software version 9 (TreeStar).

NK cell degranulation assays and cellular production of cytokines

Polyfunctionality assays simultaneously detected degranulation assays and intracellular production of TNF α and IFN γ after the NK cells encountered target cells, as previously described (Hervier B, 2011). Freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from blood by centrifugation using Ficoll-Hypaque gradient and were re-suspended at 2×10^6 /ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum plus antibiotics and nonessential amino-acids. In some experiments, PBMCs were incubated overnight in the presence of IL-12 (10 ng/ml) and IL-18 (100 ng/ml) from R&D Systems. Effector NK cells (5×10^5) were mixed or not with K562 target cells to a 1:1 ratio, and incubated at 37°C in the presence of anti-CD107a mAb (H4A3; Becton-Dickinson) to monitor degranulation. After 1 hour of incubation, monensin (GolgiStop; Becton Dickinson) and brefeldin A (GolgiPlug; Becton Dickinson) were added and cells were incubated for an additional 5 hours. NK cells were thereafter stained for cell-surface markers including CD3, CD45 and CD56. Subsequently, the cells were fixed and permeabilized with a cytofix/cytoperm kit (Becton Dickinson), and then stained for intracellular IFN γ and TNF α expression with anti-IFN γ (B27; Becton-Dickinson) and anti-TNF α (Mab11; eBioscience) mAbs. Data were analyzed with FlowJo, and the fraction of NK cells that were positive for 0, 1, 2, or 3 functions was defined using the software's "Boolean

gate" algorithm. Pestle software was used to remove background and generate a file compatible with Spice software, as previously described (Beziat V, 2012).

Serum cytokine assays

Blood samples from patients and healthy controls were processed immediately after being collected and stored at -80°C after centrifugation at 2000g for 10 min. Serum samples were thawed once only. IFN- γ was quantified in duplicate using Human IFN- γ -Quantikine ELISA kits from R&D systems, and the IFN α concentration was determined using an anti-viral IFN α cytopathic bioassay, as previously described (Hervier B, 2011).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded explanted lung samples were retrieved from 3 other patients (woman/man sex ratio =2; anti-Jo1=2 and anti-PL12=1) with severe aSS-related usual interstitial pneumonia. These pathological studies were compared with lung biopsies from one control (taken from a normal lung, at a large distance from a lung adenocarcinoma in a 75 year old patient). Serial 7- μ m tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and pretreated in 10 mM citrate buffer, pH 6, for antigen retrieval, and then stained with hematoxylin-eosin using a routine technique already described previously (Cherfils-Vicini J, 2010).

Liquid nitrogen frozen muscle biopsies of 3 independent patients (woman/man sex ratio =2; antiJo1 =3) with an aSS-related myositis were also studied by immunohistochemistry in parallel. Cryostat-cut sections (7 μ m) were stained with hematoxylin-eosin using a routine technique.

The immunohistochemical demonstration of NK cells in lungs and muscles was performed using a monoclonal anti-NKp46 (R&D Systems, Clone 195314) as previously described (Cherfils-vicini J, 2010 & Schleinitz N, 2008). The characterization of both T and B cells in the lung was performed using anti-CD3 monoclonal antibody (Dako, Clone F7.2.38) and anti-CD20 monoclonal antibody (Dako, Clone L26), respectively. In the muscle samples, these cells were stained with anti-CD3 monoclonal antibody (Dako, Clone F7.2.38) and CD79a (Dako, clone JCB117), respectively. In all cases, appropriate biotinylated secondary antibodies and diaminobenzidine visualization of the peroxidase reaction product were used in a standardized manner.

Statistical analyses

The quantitative data were described as median (minimum-maximum) values. The non-parametric Mann-Whitney *U* and Kruskal-Wallis tests were used for comparison of continuous variables between two and three groups, respectively. Correlations between

variables were calculated using non-parametric Spearman rank-order test. Principal component analysis was used to graphically assess the separation between active and inactive patients, with regards to the following variables: CD69, CD57, ILT2, NKp30 and the NK cell functions (CD107 α , IFN γ & TNF α) after IL12 + IL18 stimulation. A logistic model was build to predict the probability of having an active disease. For each prediction equation value, defined by a combination of the variables of interest (i.e. NKp30, CD57 and ILT2), sensitivity and specificity were calculated and represented by a ROC-curve.

A *p*-value < .05 was considered significant. Analyses were performed using SAS software (version 9.3, SAS institute) or Prism software (version 5.0, GraphPad).

Results

NK cell quantitative data

Flow cytometry was used to assess CD3-CD56⁺ NK cells in different groups of samples, including inactive and active aSS patients and healthy donors. *Figure 1A* shows that the proportion and the absolute count of circulating NK cells remained similar in patients with active aSS (15%, [5-19]), inactive aSS (12%, [1-20]) and controls (9% [5-20]). Moreover, the proportion of CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cell subsets was equivalent in aSS and healthy donors (*Figure 1B*).

Phenotypic repertoire of NK cells from aSS patients

In order to better characterize NK cells from aSS patients, we performed an extensive analysis of cell-surface receptors. NK cells from patients with aSS (inactive or active) were indistinguishable from that of the healthy controls, in terms of cell-surface expression of a large panel of NK receptors, including cell activation CD69, HLA-DR and NKp44, CD16/FC γ RIIIA, CD8 α NKG2D, KIRs, NKG2A NKG2C as well as the chemokine receptors CX3CR1 and CCR7 (*Figure 1C and data not shown*). More importantly, CD3-CD56^{dim} NK cells from aSS patients expressed lower levels of NKp30 compared to healthy controls (57% [22-88] vs. 81% [57-96]; *p*=0.009). This effect was significantly more pronounced in active aSS patients, compared to inactive aSS patients (88% [40-95]; *p*=0.034), suggesting an association with the disease activity. Furthermore, ILT2/CD85j was specifically and significantly

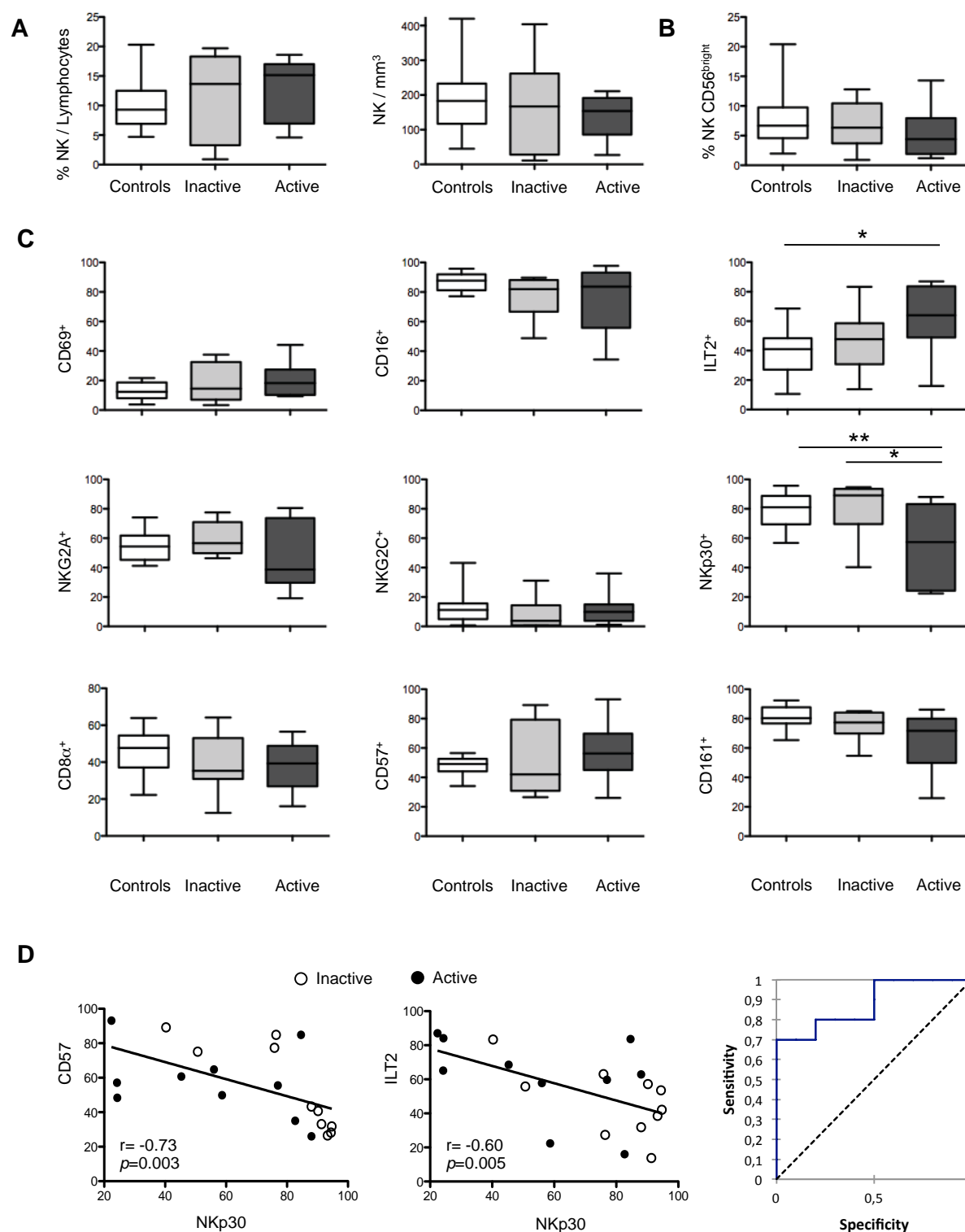


Figure 1. Quantitative and phenotypic characteristics of NK cells from aSS patients

A. Percentage and absolute count of blood CD3-CD56⁺ NK cells among the CD45⁺ lymphocyte gate. **B.** Percentage of CD56^{bright} NK cells among blood CD3-CD56⁺ NK cells. **C.** Percentage of CD3-CD56⁺ NK cells expressing different surface markers among the blood NK cells from 10 healthy donors (open boxes), 10 inactive aSS patients (grey boxes) and 10 active aSS patients (closed boxes). Data are shown as a box plot (25-75th percentiles). Lines outside the boxes represent the minimum and maximum values and lines inside the boxes the median value. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **D.** Correlation between NKp30 and CD57 and ILT2 expression on CD3-CD56⁺ NK cells from aSS patients. Open circles: inactive aSS patients, closed circles: active aSS patients. **E.** ROC curve representing for each value of a prediction equation (combining the NKp30, CD57 and ILT2) the sensitivity and the specificity in predicting disease activity.

increased in active aSS patients as compared to healthy donors (64% [16-87] vs. 41% [11-69], $p=0.016$). Two other receptors, associated with NK cell differentiation, were slightly modulated in active aSS patients. Thus, CD57 was increased (57% [26-93] vs. 49% [25-66]; $p=0.09$) whereas CD161 ($n=16$) was decreased (72% [26-86] vs. 80% [65-92], $p=0.052$), as compared to controls. Importantly, the percentage of NK cells expressing NKp30 from aSS patients was inversely correlated with both CD57 (Spearman coefficient $r=-0.73$ $p=0.003$) and ILT2 ($r=-0.60$; $p=0.005$) (Figure 1D) as well as directly correlated with CD161 ($r=-0.67$; $p=0.003$). These data were strengthened by the calculation of a prediction equation combining the CD57, ILT2 and NKp30 variables and represented as a ROC-curve, which showed significant diagnosis accuracy in predicting the aSS activity (area under the curve =0.79 compared to 0.5, $p=0.01$, Figure 1D).

The percentage of NK cells expressing both Granzyme B and Perforine was similar among patients and did not differ significantly from that of the controls (*data not shown*).

Altogether, these findings suggest that NK cells from aSS patients are highly differentiated, and markedly more so in patients with active aSS compared to inactive aSS.

NK cell functions of aSS patients

To determine the functional significance of these findings, we further examined the polyfunctionality of the NK cells, including degranulation and the intracellular production of IFN- γ and TNF- α (Figure 2A). The degranulation capacity of NK cells was assessed by measuring their ability to express CD107a at the cell surface. These measurements (Figure 2B, left panel) show that in the presence of K562 target cells, the level of CD107a is similar in aSS (inactive and active) patients and healthy controls. Similar data were obtained after an overnight stimulation by IL12 and IL18 (Figure 2B, right panel). In contrast, NK cells from patients with active and inactive aSS displayed a significant decrease of their capacity to produce IFN- γ following an overnight stimulation by IL12 and IL18. As compared to healthy controls, in active aSS patients, increased IFN- γ production was observed both spontaneously (2% [1-8] vs.

18% [2-36]; $p=0.0017$) and in the presence of K562 target cells (7% [1-20] vs. 36% [9-49]; $p<0.001$) (Figure 2B, middle & right panels). In these conditions, TNF α production was not significantly decreased (Figure 2B). Of note, serum concentrations of IFN γ and IFN α titers were below the detection thresholds (15 pg/ml and 2 IU/ml, respectively) in all patients and controls.

These data were then confirmed by a polyfunctionality analysis, in which NK cells from the different samples were investigated for multiple functional responses. As shown in Figure 2C, NK cells from aSS patients are less polyfunctional: the percentage of NK cells able to perform three functions (degranulation and production of both IFN γ and TNF α) was decreased in aSS patients compared to controls (1% [0.1-5] vs. 12% [1-19]; $p=0.003$). In the absence of stimulation, this decrease was only significant for NK cells from active aSS patients, whereas, after an overnight stimulation with IL12 and IL18, a decrease in polyfunctional activity was observed both in inactive and active aSS patients, but more significantly in the case of active aSS (Figure 2C).

Functional correlations with NKp30 in aSS patients

Our extensive phenotypic study of NK cells from aSS patients reveals a decrease in NKp30 in aSS patients, a decrease which correlates with the maturation state of the NK cells. As shown in Figure 3A, the expression of NKp30 is strongly correlated with NK cell functions, such as spontaneous and IL12 and IL18-stimulated degranulation, or IFN γ production following IL12 and IL18 stimulation, both in the absence or presence of K562 target cells. Importantly, NKp30 expression was also significantly linked to the ability of NK cells to achieve degranulation and production of IFN- γ and TNF- α , following IL12 + IL18 overnight stimulation ($r=0.57$, $p=0.009$).

These correlations were corroborated by a multivariate descriptive analysis (principal component analysis) which graphically showed how the different variables were closely associated: the increased receptors CD69, ILT2 and CD57 clustered together, whereas NKp30 was linked to degranulation and cytokine

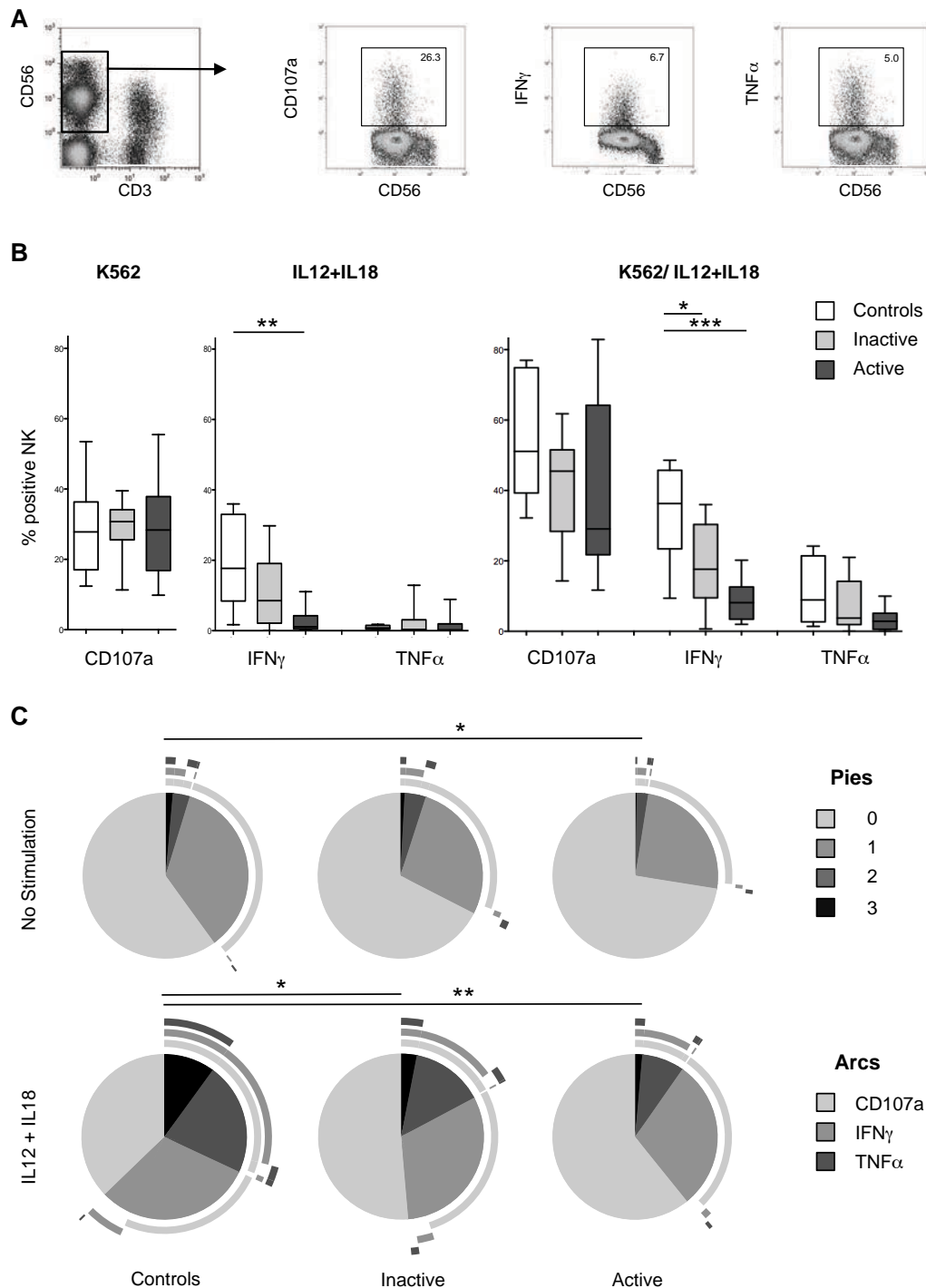


Figure 2. NK cell functionality

A. Representative data of NK cell functions by Flow cytometry after a 5h-polyfunctional assay in the presence of K562 target cells (at a 1:1 Effector(E)/Target (T) ratio). NK cell degranulation (CD107a) and intracellular production of IFN γ and TNF α is measured by gating on CD3⁺CD56⁺ NK cells. **B.** Degranulation (CD107a) and intra-cellular cytokine (IFN- γ and TNF- α) production in NK cells from 10 healthy donors (open boxes), 10 inactive aSS patients (grey boxes) and 10 active aSS patients (closed boxes). Data are shown as a box plot (25-75th percentiles). Lines outside the boxes represent the minimum and maximum values and lines inside the boxes the median value. Freshly isolated PBMCs were either non-stimulated (left panel) or stimulated overnight (right panel) by IL12 plus IL18. Degranulation was determined by measuring the percentage of CD107a positive NK cells against K562 target cells, at a 1:1 E/T ratio. Cytokine production was assessed by measuring the frequency of NK cells expressing IFN- γ and TNF- α . **C.** Polyfunctionality assays of resting or IL12 plus IL18 stimulating NK cells from 10 healthy donors (control), 10 inactive aSS patients (inactive) and 10 active aSS patients (active) were tested against K562 target cells. Data were analyzed with the Boolean gate algorithm available in FlowJo, version 8.8 (TreeStar). Pie and Arc charts were generated using Spice software Version 5.2 (NIAI freeware). Pies represent the frequency of NK cells positive for 0, 1, 2 or 3 responses (to CD107a, IFN- γ and TNF- α). Arcs depict the frequency of positive cells for CD107a, IFN γ and TNF α , respectively. The proportion of NK cells performing 3 functions was compared between groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

production by NK cells, which were all decreased (*Figure 3B*). Notably, according to these different variables, active and inactive aSS patients are quite well grouped together.

Histological study of NK cells in the target tissues

In addition to the study of circulating NK cells, which yielded new insights into the characterization of some types of target tissue involved in aSS, an immunohistological analysis was also performed.

As expected, the histological analyses of different muscle biopsy specimens ($n=3$) showed myopathic changes, including predominant peri-fascicular necrosis or atrophy as well as inflammatory infiltrates within both the perimysium and endomysium. Based on immunohistochemistry analyses, cells infiltrating the endomysium were distributed as follows: $CD3^+$ T cells > $CD79a^+$ B cells. Interestingly, the presence of rare NK cells ($n=0.3/mm^2$), which represented < 2% of the total immune cell count, was observed both with the other inflammatory cell infiltrates and in proximity to the myofibers of biopsies from aSS patients and not from a healthy control (*Figure 4A*).

Histological features of aSS patient lungs were consistent with severe and diffuse fibrotic lesions, characteristic of usual interstitial pneumonia. Cellular infiltrates were intense and diffuse, especially in the most fibrotic zones. The characterization of the inflammatory cells by immunohistochemistry showed the presence of $CD3^+$ T cells, especially $CD8^+$ T cells, spreading all over the fibrotic lesions and also clustered together within tertiary follicular structures, in which $CD20^+$ B cells were also visible (*data not shown*). Importantly, a high and significantly increased number of NK cells was observed in the lungs of aSS patients as compared to the controls ($n=18$ vs $5/mm^2$). Interestingly, NK cells were excluded from the tertiary follicular structures, but distributed all throughout the areas of fibrosis (*Figure 4C & D*).

Discussion

In the current study, we report for the first time phenotypic and functional changes of NK cells in

aSS patients. Of note, most of these changes are

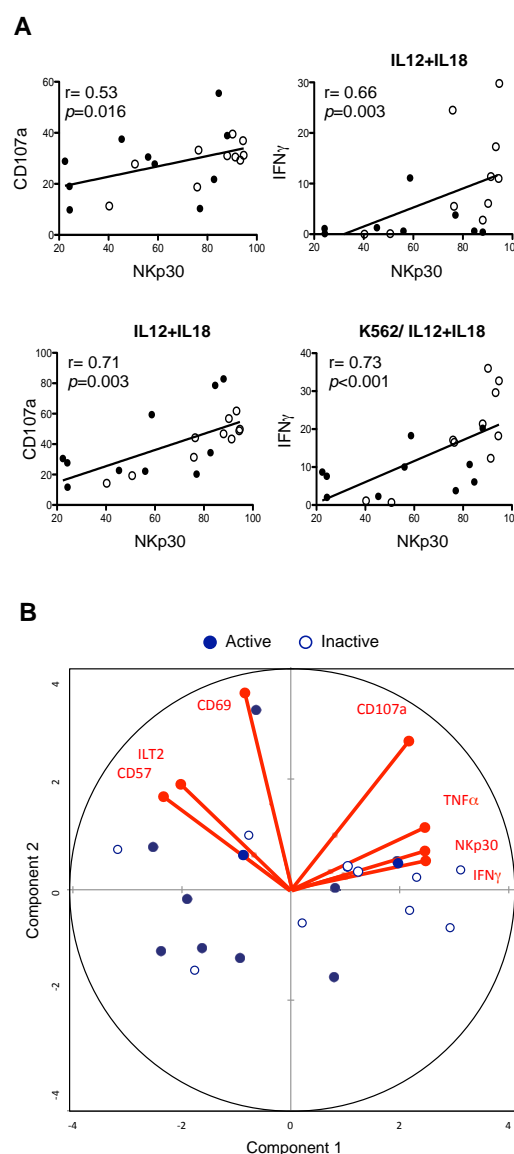


Figure 3. Functional correlations with NKp30

A. Significant correlations between NKp30 and the NK cell-functions, i.e. degranulation (CD107a) and cytokine productions in different experimental conditions. **B.** Principal component analysis graphically showing the statistical proximity between the different variables that were tested, as well as the distribution of the patients according to the differential expression of these variables. Open circles: inactive aSS patients, closed circle: active aSS patients.

consistent with previous data from our team (*Nguyen N, 2005*) and others (*Vitale C, 2004*) describing the process of NK-cell differentiation. Indeed, this process is associated with a number of phenotypic and functional changes (*Luetke-Eversloh M, 2013*) close to those observed in aSS: NK cells from active patients displayed a

differentiated phenotype with a low level of CD161 and high expression of CD57 and ILT2. Furthermore, NK cells from aSS patients expressed low levels of NKp30, a receptor belonging to the natural cytotoxicity receptor family and usually slightly decreased at the terminal differentiation stage (*Luetke-Eversloh, 2013*). However, the transcription of the NKp30 gene is subject to alternative splicing, resulting in various isoforms equipped with distinct effector functions (*Delahaye NF, Nature 2011*). Furthermore, genetic polymorphisms within the promoter region of NKp30 have recently been associated with Sjögren's Syndrome and in the context of that autoimmune disease, were correlated with higher NKp30 expression in blood NK cells (*Rusakiewicz S, 2013*). It would thus be interesting to determine whether NKp30 polymorphisms have a link with aSS.

Our in-depth analysis reveals that NKp30 down-modulation was strongly linked to aSS activity. Likewise, the modulations of ILT2 and CD57 also tended to be associated with aSS activity. These results are further supported by accuracy of the the prediction equation combining these three variables in predicting the activity of aSS, as attested by the area under the ROC-curve. The terminal differentiation status of NK cells from active aSS is also consistent with their inability to efficiently produce IFN γ after IL12 plus IL18 stimulation and their strong capacity to express perforin and granzyme, as previously described (*Beziat V, 2012*). Taken together, these results strongly suggest that NK cells and their differentiation process play a role in the development of the pathogenesis of aSS.

The activating NK-cell receptor NKp30 also represents a surrogate marker for NK cell functions in humans (*Pende D, 1999*). Moreover, NKp30 is involved to a significant extent in both dendritic cell (DC) killing and maturation (*Ferlazzo G, 2002; Vitale M, 2005*). This crosstalk between NK and DC cells appears to be critical not only for tumor-cell recognition (*Brandt CS, 2009*), but also in influencing the prognosis of different infectious diseases (*Mavilio D, 2006; Mavoungou E, 2007; Beziat EJI 2012*). In the current study, NKp30 expression was strongly correlated with loss of NK cell functions, which was specifically associated with aSS activity,

regardless of the experimental conditions. This dramatic decrease in the circulating level of NKp30 expression, which is particularly apparent in active aSS patients, correlated specifically with a decrease in IFN γ production. Overall, these results indicate that NK-DC cell crosstalk could be involved in the pathogenesis of aSS.

Though our data are contrasting to those recently described in Primary Sjögren's Syndrome (*Rusakiewicz 2013*), it is important to note that a low expression of NKp30 has previously been reported in a small series of patients with Systemic Sclerosis (*Puxeddu I, 2012*), another autoimmune disease also commonly characterized by interstitial lung disease, a manifestation shared with aSS. These contrasting results are however consistent with the simultaneously harmful and beneficial role of NK cells observed in various human inflammatory and autoimmune diseases, including macrophage activation syndromes, psoriatic arthritis, multiple sclerosis and SLE (*Fogel LA, 2013*), suggesting that NK cells could be more specifically involved in lung fibrosis. Indeed, the staining of paraffin-embedded tissue sections revealed an important infiltration of NK cells within the lung of patients with aSS-related interstitial lung disease. Of note, the presence of NK cells in the explanted lungs of aSS patients with a long and refractory disease history despite immunosuppressive treatments, suggested a persistent involvement of NK cells. To date, the role of NK cells in the pathogenesis of lung fibrosis remains unclear, and their involvement in this process in the context of autoimmune diseases, including aSS, is not known. Some studies have reported reduced NK cell functions in diseases leading to pulmonary fibrosis (*Lu LM, 2007*) through the lack of interactions of NK cells with epithelial cells or collagen-producing cells, which involved the NKG2D-MIC-A/B pathway (*Aquino-Galvez A, 2009*). However, there is no evidence for such a mechanism in aSS, since this activating receptor is normally expressed on blood NK cells. Our results are however consistent with some animal models suggesting that NK cells could prevent lung fibrosis, through the production of IFN γ (*Jiang D, 2004*) which was dramatically

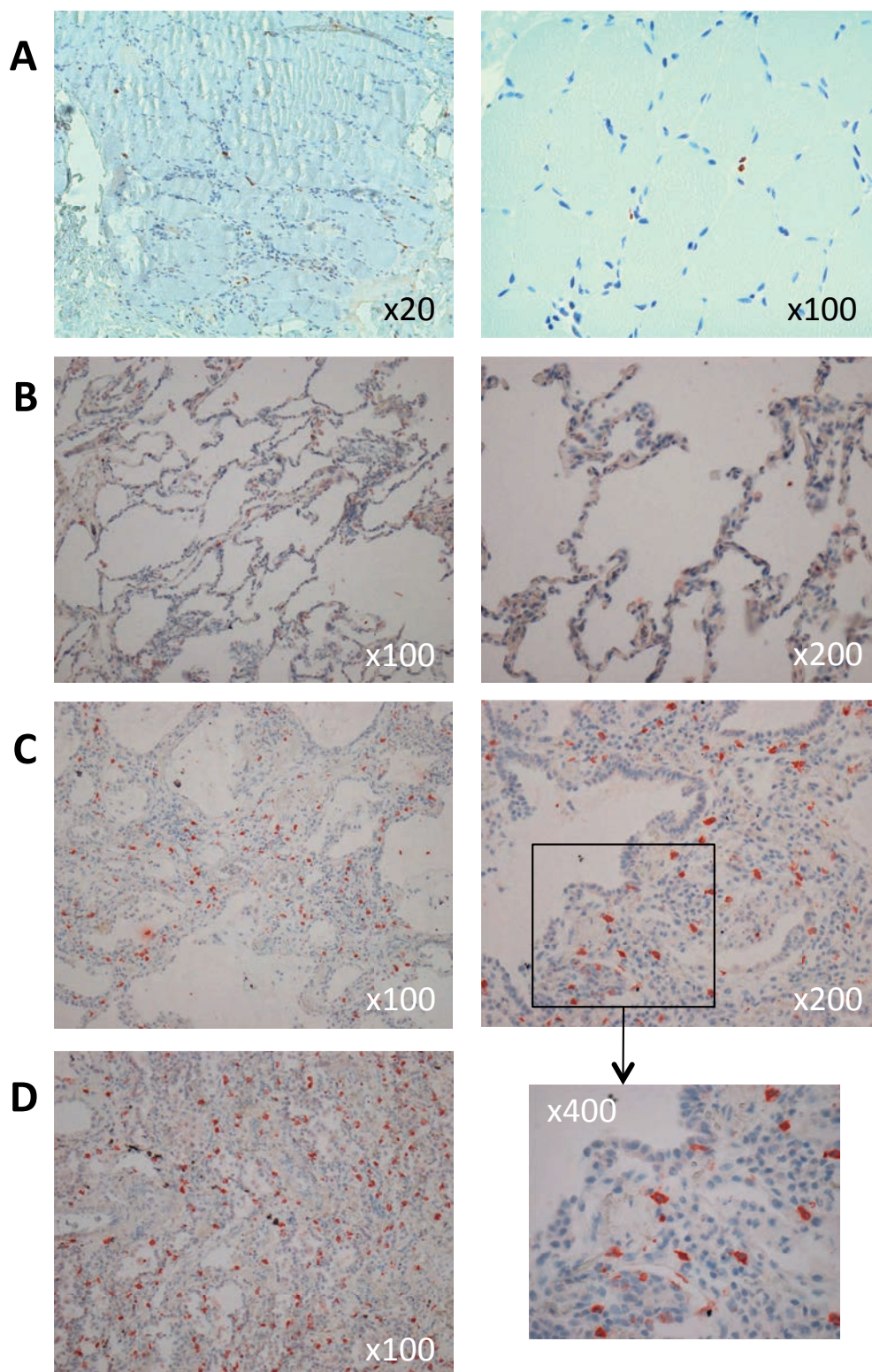


Figure 4. NK cell Immunohistochemistry stainings

A. Muscle section: example of the NKp46 staining in the muscle of one aSS patient: few NK cells are present in the endomysial infiltrate. **B.** Lung section : NKp46 staining in a normal lung (hematoxylin-eosin stained section). **C.** Lung section: NKp46 staining in a patient with aSS (hematoxylin-eosin stained section), showing a usual interstitial pneumonia with intense fibrosis. The distribution of NKp46⁺ NK cells is dense and diffuse. **D.** Lung section: another example of the NKp46 staining in another patient with aSS (hematoxylin-eosin stained section), showing intense fibrosing usual interstitial pneumonia. The distribution of NKp46⁺ NK cells is also dense and diffuse.

impaired in aSS patients. Nevertheless, since IFN γ treatment does not improve the course of idiopathic pulmonary fibrosis in humans (*King TE Jr, 2009*), such an imbalance between TH1/TH2 cytokine polarization in the lungs remains to be confirmed in aSS.

Importantly, immune events occurring in the lung have been shown to be the primary trigger of aSS (*Howard O, 2002*). It has been hypothesized that the cleavage of the histidyl-tRNA synthetase autoantigen by Granzyme B, a serine protease expressed in large amounts by the cytoplasmic granules of the NK cells, could recruit and stimulate immune cells. Thus, it is possible that functional blood NK cells invade the lungs of aSS patients, both initiating and sustaining the disease, in which the autoantibody production persisted over time (*Stone KB, 2008*).

An alternate model of the development of aSS, based on animal models, would assume that muscle tissue is the primary target (*Fernandez I,*

2013). Here, we show for the first time the presence of some NK cells within the muscles of aSS patients. Though such a finding is rare in this aSS-target tissue, usually devoid of resident-tissue NK cells, the presence of NK cells in muscle infiltrates from patients with inflammatory myopathy has so far never been demonstrated (*Schleinitz N, 2008*). The exact role of NK cells within the muscle remains however to be precisely characterized, but the presence of these NK cells both within the immune cell infiltrates and alone in the contact of muscle fibers could argue for both immunoregulatory and effector effects of NK cells in this tissue.

With regards to our blood and tissue compartment results, we assume that NK cells are strongly implicated in the aSS pathogenesis. Further work is however needed to determine the exact role of NK cells within the tissue and whether this pathway could be drug targetable.

References

Aggarwal R, Cassidy E, Fertig N, Koontz DC, Lucas M, Ascherman DP, Oddis CV. Patients with non-Jo-1 anti-tRNA-synthetase autoantibodies have worse survival than Jo-1 positive patients. *Ann Rheum Dis.* 2014 Jan;73(1):227-32.

Aquino-Galvez A, Pérez-Rodríguez M, Camarena A, Falfan-Valencia R, Ruiz V, Montaña M, Barrera L, Sada-Ovalle I, Ramírez R, Granados J, Pardo A, Selman M. MICA polymorphisms and decreased expression of the MICA receptor NKG2D contribute to idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility. *Hum Genet.* 2009 Jun;125(5-6):639-48.

Béziat V, Dalgard O, Asselah T, Halfon P, Bedossa P, Boudifa A, Hervier B, Theodorou I, Martinot M, Debré P, Björkström NK, Malmberg KJ, Marcellin P, Veillard V. CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol.* 2012 Feb;42(2):447-57.

Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliandro R, Magdeleinat P, Mami-Chouaib F, Dieu-Nosjean MC, Fridman WH, Damotte D, Sautès-Fridman C, Cremer I. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest.* 2010 Apr;120(4):1285-97.

Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaehri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 2001 May 15;97(10):3146-51.

Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Ménard C, Roux S, Lyonnet L, Paul P, Sarabi M, Chaput N, Semeraro M, Minard-Colin V, Poirier-Colame V, Chaba K, Flament C, Baud V,

Authier H, Kerdine-Römer S, Pallardy M, Cremer I, Peaudecerf L, Rocha B, Valteau-Couanet D, Gutierrez JC, Nunès JA, Commo F, Bonvalot S, Ibrahim N, Terrier P, Opolon P, Bottino C, Moretta A, Tavernier J, Rihet P, Coindre JM, Blay JY, Isambert N, Emile JF, Vivier E, Lécésne A, Kroemer G, Zitvogel L. Alternatively spliced Nkp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med.* 2011 Jun;17(6):700-7.

Eloranta ML, Barbasso Helmers S, Ulfgrén AK, Rönnblom L, Alm GV, Lundberg IE. A possible mechanism for endogenous activation of the type I interferon system in myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro 52/anti-Ro 60 autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 2007 Sep;56(9):3112-24.

Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med.* 2002 Feb 4;195(3):343-51.

Fernandez I, Harlow L, Zang Y, Liu-Bryan R, Ridgway WM, Clemens PR, Ascherman DP. Functional redundancy of MyD88-dependent signaling pathways in a murine model of histidyl-transfer RNA synthetase-induced myositis. *J Immunol.* 2013 Aug 15;191(4):1865-72.

Fogel LA, Yokoyama WM, French AR. Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res Ther.* 2013 Jul 11;15(4):216. [Epub ahead of print].

Hervier B, Benveniste O. Clinical heterogeneity and outcomes of antisynthetase syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2013 Aug;15(8):349.

Hervier B, Devilliers H, Stanciu R, Meyer A, Uzunhan Y, Masseau A, Dubucquoi S, Hatron PY, Musset L, Wallaert B, Nunes H, Maisonneuve T, Olsson NO, Adoue D, Arlet P, Sibilia J,

- Guiguet M, Lauque D, Amoura Z, Hachulla E, Hamidou M, Benveniste O. Hierarchical cluster and survival analyses of antisynthetase syndrome: phenotype and outcome are correlated with anti-tRNA synthetase antibody specificity. *Autoimmun Rev.* 2012 Dec;12(2):210-7.
- Hervier B, Beziat V, Haroche J, Mathian A, Lebon P, Ghillani-Dalbin P, Musset L, Debré P, Amoura Z, Vieillard V. Phenotype and function of natural killer cells in systemic lupus erythematosus: excess interferon- γ production in patients with active disease. *Arthritis Rheum.* 2011 Jun;63(6):1698-706.
- Howard OM, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, Casciola-Rosen L, Härtlein M, Kron M, Yang D, Yiadom K, Dwivedi S, Plotz PH, Oppenheim JJ. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2002 Sep 16;196(6):781-91.
- Jiang D, Liang J, Hodge J, Lu B, Zhu Z, Yu S, Fan J, Gao Y, Yin Z, Homer R, Gerard C, Noble PW. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *J Clin Invest.* 2004 Jul;114(2):291-9.
- King TE Jr, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Hormel P, Lancaster L, Noble PW, Sahn SA, Szwarcberg J, Thomeer M, Valeyre D, du Bois RM; INSPIRE Study Group. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2009 Jul 18;374(9685):222-8.
- Krystufková O, Vallerskog T, Helmers SB, Mann H, Putová I, Beláček J, Malmström V, Trollmo C, Vencovsky J, Lundberg IE. Increased serum levels of B cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis.* 2009 Jun;68(6):836-43.
- Levine SM, Raben N, Xie D, Askin FB, Tudor R, Mullins M, Rosen A, Casciola-Rosen LA. Novel conformation of histidyl-transfer RNA synthetase in the lung: the target tissue in Jo-1 autoantibody-associated myositis. *Arthritis Rheum.* 2007 Aug;56(8):2729-39.
- Lu LM, Zavitz CC, Chen B, Kianpour S, Wan Y, Stämpfli MR. Cigarette smoke impairs NK cell-dependent tumor immune surveillance. *J Immunol.* 2007 Jan 15;178(2):936-43.
- Luetke-Eversloh M, Killig M, Romagnani C. Signatures of Human NK Cell Development and Terminal Differentiation. *Front Immunol.* 2013 Dec 30;4:499.
- Mavilio D, Lombardo G, Kinter A, Fogli M, La Sala A, Ortolano S, Farschi A, Follmann D, Gregg R, Kovacs C, Marcenaro E, Pende D, Moretta A, Fauci AS. Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2006 Oct 2;203(10):2339-50.
- Mavoungou E, Held J, Mewono L, Kremsner PG. A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *J Infect Dis.* 2007 May 15;195(10):1521-31.
- Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, Kuentz M, Al Jijakli A, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Boudifa A, Debré P, Vieillard V. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood.* 2005 May 15;105(10):4135-42.
- Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med.* 1999 Nov 15;190(10):1505-16.
- Puxeddu I, Bongiorno F, Chimenti D, Bombardieri S, Moretta A, Bottino C, Migliorini P. Cell surface expression of activating receptors and co-receptors on peripheral blood NK cells in systemic autoimmune diseases. *Scand J Rheumatol.* 2012 Aug;41(4):298-304.
- Rusakiewicz S, Nocturne G, Lazure T, Semeraro M, Flament C, Caillat-Zucman S, Sène D, Delahaye N, Vivier E, Chaba K, Poirier-Colame V, Nordmark G, Eloranta ML, Eriksson P, Theander E, Forsblad-d'Elia H, Omdal R, Wahren-Herlenius M, Jonsson R, Rönnblom L, Nititham J, Taylor KE, Lessard CJ, Sivits KL, Gottenberg JE, Criswell LA, Miceli-Richard C, Zitvogel L, Mariette X. NCR3/NKp30 contributes to pathogenesis in primary Sjögren's syndrome. *Sci Transl Med.* 2013 Jul 24;5(195):195ra96.
- Schleinitz N, Cognet C, Guia S, Laugier-Anfossi F, Baratin M, Pouget J, Pelissier JF, Harle JR, Vivier E, Figarella-Branger D. Expression of the CD85j (leukocyte Ig-like receptor 1, Ig-like transcript 2) receptor for class I major histocompatibility complex molecules in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum.* 2008 Oct;58(10):3216-23.
- Stanciu R, Guiguet M, Musset L, Touitou D, Beigelman C, Rigolet A, Costedoat-Chalumeau N, Allenbach Y, Hervier B, Dubourg O, Maisonnobe T, Charuel JL, Behin A, Herson S, Amoura Z, Grenier P, Benveniste O. Antisynthetase syndrome with anti-Jo1 antibodies in 48 patients: pulmonary involvement predicts disease-modifying antirheumatic drug use. *J Rheumatol.* 2012 Sep;39(9):1835-9.
- Stone KB, Oddis CV, Fertig N, Katsumata Y, Lucas M, Vogt M, Domsic R, Ascherman DP. Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum.* 2007 Sep;56(9):3125-31.
- Vitale C, Chiossone L, Morreale G, Lanino E, Cottalasso F, Moretti S, Dini G, Moretta L, Mingari MC. Analysis of the activating receptors and cytolytic function of human natural killer cells undergoing in vivo differentiation after allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Immunol.* 2004 Feb;34(2):455-60.
- Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Aricò M, Moretta L, Moretta A. NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood.* 2005 Jul 15;106(2):566-71.
- Vivier E, Ugolini S, Nunès JA. ADAPted secretion of cytokines in NK cells. *Nat Immunol.* 2013 Nov;14(11):1108-10. doi: 10.1038/ni.2737.
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011 Jan 7;331(6013):44-9. doi: 10.1126/science.1198687. Review

4.2. Interprétation des résultats

Au cours du Syndrome des Antisynthétases, cette étude a principalement montré que :

- i) Comme au cours du Lupus Systémique, les cellules NK présentent des anomalies phénotypiques et fonctionnelles qui sont plus marquées lorsque la maladie est active.
- ii) Contrairement aux données obtenues au cours du Lupus Systémique, les cellules NK sont phénotypiquement matures, et ceci n'est pas lié aux taux sériques d'IFN α dont les concentrations mesurées par un test biologique standardisé sont normales. L'expression de NKp30 (NCR3) est diminuée et corrèle avec l'activité de la maladie et les autres anomalies NK constatées, comme une diminution de leurs capacités fonctionnelles, pouvant donc suggérer l'implication de ce récepteur dans la physiopathologie de la maladie.
- iii) Les cellules NK sont anormalement présentes dans les tissus cibles, ce qui est un argument supplémentaire pour leur implication dans l'immunopathologie de la maladie.

4.3. Discussion complémentaire

Afin de préciser le rôle immunopathologique des cellules NK au cours du Syndrome des Antisynthétases, il serait intéressant de mieux caractériser le phénotype des cellules NK dans les organes cibles, notamment dans les poumons. L'étude de marqueurs tels que NKp30 et les différents récepteurs incriminés au niveau des cellules NK sanguines ainsi que des marquages intracellulaires de Granzyme B et d'autres protéines cytotoxiques, réalisé sur des cellules NK pulmonaires obtenues à partir de lavages broncho-alvéolaires, seraient très informatives. Cela permettrait probablement d'établir un lien physiopathologique entre les anomalies constatées dans ces différents compartiments, qui ne sont pas toujours similaires d'après les données disponibles au cours de différentes pathologies pulmonaires étudiées jusqu'ici [288]. De même, des marquages spécifiques NKp30 et Granzyme B en immunohistochimie pourraient être envisagés dans les biopsies pulmonaires.

Pour mieux apprécier le rôle des NK dans ces tissus cibles et les interactions éventuelles des cellules NK avec les autres cellules immunitaires innées des

caractérisations complémentaires en immunohistochimie pourrait également être réalisées : marquages des ligands connus de NKp30 comme B7-H6, identification et localisation des différentes cellules dendritiques ou encore des monocytes etc...

Parallèlement à un rôle immunopathologique, les cellules NK pourraient aussi jouer un rôle déterminant dans le processus de fibrose pulmonaire. L'étude de tels mécanismes sont complexes, mais une comparaison des données immunohistochimiques entre le Syndrome des Antisynthétases, d'autres maladies auto-immunes au cours desquelles il existe une pneumopathie infiltrante diffuse comme la Sclérodermie Systémique, et la fibrose pulmonaire idiopathique non réputé être d'origine auto-immune serait une approche discriminante.

Par ailleurs, les études réalisées sur les cellules NK au cours de deux maladies auto-immunes systémiques, le Lupus Systémique et le Syndrome des Antisynthétases suggère que le rôle joué par ces cellules n'est pas toujours identique. En effet, du point de vue phénotypique comme du point de vue fonctionnel, les anomalies constatées au cours de ces deux maladies sont différentes. Le fait que ne soit pas observé de corrélation entre la production d'IFN α sérique et les capacités de production d'IFN γ par les cellules NK chez les patients atteints de Syndrome des Antisynthétases renforce indirectement l'hypothèse du lien entre ces deux cytokines rapporté au cours du Lupus Systémique.

IV. Discussion générale et Perspectives

L'objectif de cette discussion générale est de replacer les anomalies des cellules NK qui ont été constatées au cours des deux maladies auto-immunes étudiées au sein d'une réponse immunitaire globale et complexe, afin de proposer des applications complémentaires, tant sur le plan immunologique que médical.

1. Anomalies des cellules NK constatées au cours des maladies auto-immunes

1.1. Anomalies des cellules NK au cours du Lupus Systémique

Les anomalies qui ont été constatées chez les patients atteints de Lupus Systémique dans ce travail (*Résultats 1 et 3*), complétées des données récentes de la littérature sur le sujet, sont résumées dans la *Figure 12*.

1.1.1. Hypothèses immunopathologiques

Les cellules NK circulantes au cours du Lupus Systémique sont quantitativement diminuées mais qualitativement activées et tournées vers la production de cytokines plutôt que vers les fonctions cytotoxiques. Ceci pourrait être lié à un certain degré d'immaturité, attesté par un phénotype particulier (NKG2A^{high}, CD16^{low}, CD8α^{low} et KIR^{low}) et une forte capacité à produire de l'IFNγ.

A ce jour, peu de travaux ont mis en évidence des anomalies intrinsèques des cellules NK au cours du Lupus Systémique. Certaines données de la littérature ont montré l'existence d'un défaut de maturation des cellules NK en rapport avec des anomalies d'expression du facteur de croissance c-kit [283]. Par contre, les anomalies de DAP12 [289], un adaptateur transmembranaire permettant la transduction de signaux activateurs par l'intermédiaire de motifs ITAMs, qui avaient été suggérées, n'ont pas été confirmées [290]. Enfin, les associations de certains haplotypes KIR avec le Lupus Systémique sont faibles et leurs conséquences éventuelles sur le plan fonctionnel en terme d'éducation restent à être confirmées [291]. Bien que cela n'ait pas été l'objet des études présentées ici et contrairement à ce qui a récemment été démontré pour le Syndrome de Gougerot-Sjögren [276], il n'a pas été clairement identifié d'anomalie intrinsèque aux cellules NK. Les cellules NK en elles-mêmes ne semblent pas être un facteur de risque de développer un Lupus Systémique.

Il est cependant intéressant de noter que *Huang Z et coll.* [284] ont constaté une activation puis une migration des cellules NK dans les tissus cibles de la maladie ainsi qu'une entrée en apoptose favorisée par l'IFN α , dont les concentrations sériques corréleraient clairement avec l'activité de la maladie. Ceci suggère que les anomalies des cellules NK circulantes au cours du Lupus Systémique sont surtout la conséquence de facteurs immunologiques externes à ces dernières. Les résultats présentés dans ce mémoire vont également dans ce sens (*Résultats 3*). En effet, les anomalies d'activation et de production d'IFN γ par les cellules NK qui ont été observées au cours des travaux présentés ici, concernent majoritairement les patients en phase active de la maladie, tandis que les patients en rémission présentent des cellules NK qui sont phénotypiquement proches de celles des sujets contrôles.

Par ailleurs, les travaux rapportés ici montrent que les cellules NK subissent l'influence de stimuli externes autres que l'IFN α lui-même, car ce dernier n'est pas suffisant pour expliquer l'ensemble des anomalies constatées, dont la production excessive d'IFN γ . Au cours de ce travail, il a été mis en évidence que des activateurs de la voie TLR9 jouent un rôle majeur, comme certains auto-antigènes du Lupus Systémique : les ADN double brin qui sont fixés aux immunoglobulines sous la forme de complexes immuns circulants. Il est d'ailleurs important de noter que les taux de ces complexes immuns corréleraient aussi avec l'activité de la maladie [118]. D'après les résultats obtenus à partir de cultures de cellules NK triées, ces complexes immuns interagiraient directement avec les cellules NK, mais leur action n'est toutefois pas suffisante pour rendre ces cellules pleinement actives et fonctionnelles. Les cellules NK doivent donc nécessairement recevoir d'autres signaux. Ces derniers peuvent provenir de facteurs solubles ou d'interactions cellules-cellules. Ces résultats suggèrent donc que les micro-environnements cellulaires et tissulaires jouent un rôle prépondérant sur la fonctionnalité des cellules NK au cours du Lupus Systémique.

De façon importante, des résultats similaires ont été obtenus par d'autres équipes, à partir de complexes immuns circulant contenant des ribo-nucléoprotéines et de l'ARN, qui sont également des ligands de TLRs intracellulaires (TLR7).

Différentes données -fondamentales ou consacrées aux patients atteints de Lupus Systémique- suggèrent que les cellules NK pourraient interagir avec différents types de cellules immunitaires. Elles communiqueraient principalement avec les pDCs [292,293] mais aussi avec les lymphocytes B [75], deux types cellulaires activement impliqués

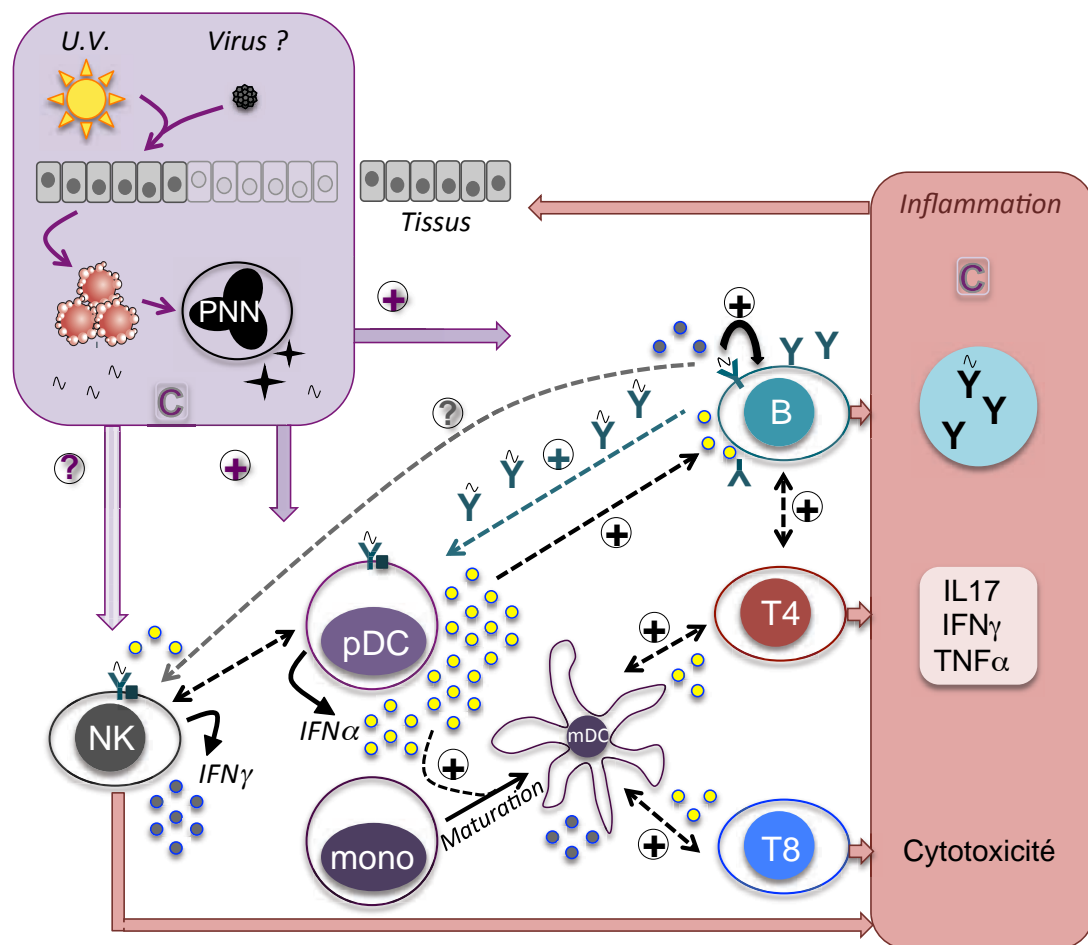


Figure 12 : Place des cellules NK dans l'immunopathologie du Lupus Systémique.

C : Complément. pDC : cellules dendritique plasmacytoïde.

Les cellules NK sont sensibles à des messagers solubles : IFN α et Complexes Immuns circulants portant des ADN double brin (ligands de TLR9). Elles sont également capables d'interagir avec les pDCs par l'intermédiaire d'interactions cellules-cellules. Elles sont capables de produire de l'IFN γ , puissant activateur du système immunitaire adaptatif. Par ce biais, ainsi que par des actions cytotoxiques, elles participeraient à l'inflammation tissulaire dans les organes cibles.

dans l'immunopathologie du Lupus ; les pDCs produisant de l'IFN α et les cellules B à l'origine des auto-anticorps. Par ailleurs, il a été montré que ces différents types cellulaires peuvent être stimulés par des ligands de TLR7 et de TLR9. Bien que non démontré la stimulation conjointe de ces trois types cellulaires et leurs interactions respectives dans des tissus affectés par le Lupus Systémique (comme la peau par exemple), pourrait être nécessaire à leur activation puis à celle de l'ensemble des éléments du système immunitaire mis en jeu au cours du Lupus Systémique.

Il est intéressant de remarquer que des interactions entre des cellules NK et des pDCs ont été mises en évidence *in vitro* par Hagberg *et coll.* Ces auteurs ont en effet montré qu'au cours de co-cultures avec des cellules NK, les pDCs stimulées augmentent leurs capacités de production d'IFN α . Ce phénomène nécessite des messages solubles (MIP-1 β) et des contacts cellulaires (impliquant LFA-1, CRACC et LY-9) entre les cellules NK et les pDCs [292,293]. Toutefois, ces derniers n'impliqueraient pas directement la voie TLR7 sur les cellules NK.

De tels mécanismes pourraient être réciproques, puisque la production d'IFN γ par les cellules NK est également augmentée dans ces conditions expérimentales. Cette hypothèse devra être vérifiée au moins *in vitro*.

De plus, des interactions entre des lymphocytes B et des pDCs ont été mises en évidence chez des patients atteints de Lupus Systémique [294]. Ces dernières concernent aussi bien des lymphocytes B naïfs que mémoires et mettent en jeu des facteurs solubles (non identifiés formellement) et des contacts cellulaires dépendants du CD31.

Il ne semble pas que des interactions entre des cellules NK et des lymphocytes B aient été mises en évidence chez des patients atteints de Lupus Systémique. Toutefois, de telles interactions ont été démontrées notamment dans des modèles murins [75] et sont d'autant plus marquées que les deux types cellulaires sont préalablement activés. Une telle activation peut être obtenue par l'intermédiaire des ligands des TLRs intracellulaires, ce qui suggère que des interactions entre des cellules NK et des lymphocytes B sont envisageables au cours du Lupus Systémique. Celles-ci restent cependant à démontrer.

L'ensemble de ces résultats serait en faveur d'une coopération de type « ménage à 3 », incluant des pDCs, des lymphocytes B et des cellules NK. Différents modèles *in vitro* (par déplétions ou tris cellulaires) pourraient permettre d'étudier ces interactions chez les patients atteints de Lupus Systémique. Des analyses histologiques dans les

tissus cibles de la maladie pourraient également étayer *in vivo* ces hypothèses à partir d'études immunohistochimiques ou en microscopie confocale.

1.1.2. Conséquences possibles des anomalies NK constatées

En dehors, de l'action des cellules NK sur la fonctionnalité des pDCs [292,293] et des conséquences connues de la sécrétion d'IFN γ sur les acteurs de l'immunité adaptative (monocytes, lymphocytes B et lymphocytes T) [72], les autres conséquences des anomalies des cellules NK restent mal comprises. Ainsi, l'impact de la faible cytotoxicité des cellules NK circulantes qui a été observée (*Résultats 1*) et rapportée dans d'autres études consacrées au Lupus Systémique (*Table 3*) peut-être envisagé de plusieurs façons. Une conséquence séduisante mais hypothétique, adaptée des études portant sur les interactions avec les cellules dendritiques dérivées des monocytes, concernerait la promotion indirecte de l'auto-immunité par les cellules NK à travers un défaut de lyse des mDCs immatures. En effet, si ces cellules étaient moins contrôlées par les cellules NK au cours du Lupus Systémique, elles seraient plus nombreuses à maturer et à stimuler les cellules du système immunitaire adaptatif en présentant des peptides du soi. Toutefois, il n'est pas certain que les anomalies des cellules NK observées dans le sang soit le reflet strict de leurs fonctions dans les tissus. Les résultats de *Huang Z et coll.* [284] concernant la migration des cellules NK activées dans des organes cibles sous l'influence de l'IFN α , semblent indiquer au contraire que les observations dans le sang ne représentent qu'une image en négatif de ce qui peut se dérouler dans les tissus. Dans le cadre d'une telle hypothèse, les cellules NK tissulaires auraient au contraire un effet cytotoxique majoré et pourraient jouer aussi bien un rôle protecteur, par la lyse des cellules dendritiques myéloïdes immatures, que délétère, en exerçant une cytotoxicité contre les cellules structurales des tissus cibles. Ces hypothèses soulignent les limites liées à l'étude exclusive des cellules immunitaires circulantes et la nécessité de les coupler avec des analyses dans les organes cibles et lymphoïdes secondaires.

1.2. Anomalies des cellules NK au cours du Syndrome des Antisynthétases

1.2.1. Hypothèses immunopathologiques

Contrairement au Lupus Systémique, les anomalies des cellules NK circulantes constatées au cours du Syndrome des Antisynthétases indiquent que ces dernières sont hypermatures mais hypofonctionnelles. Notamment, la proportion de cellules NK circulantes exprimant NKp30, récepteur principal des interactions avec les cellules dendritiques myéloïdes, est diminuée et les capacités de production d'IFN γ sévèrement altérées, surtout chez les patients en phase active (*Résultats 4*). De façon similaire à ce qui a été observé au cours du Lupus Systémique, il est constaté dans cette maladie auto-immune alternant également des phases de poussée et rémission, que les cellules NK des patients en rémission restent très proches de celles des sujets contrôles. Dans la limite des marqueurs étudiés au cours de ce travail, ceci suggère que les cellules NK ne sont pas porteuses d'anomalies intrinsèques qui puissent être considérées comme facteurs de risque de développer cette maladie auto-immune multifactorielle.

Les analyses présentées ici étant essentiellement descriptives, il est pour le moment difficile d'envisager la cause de ces anomalies, mais à la différence du Lupus Systémique, l'absence d'augmentation de l'IFN α sérique suggère qu'elles ne sont pas en lien avec l'action systémique de cette cytokine.

1.2.2. Conséquences possibles

La présence de nombreuses cellules NK dans le tissu pulmonaire où sont fortement exprimés les auto-antigènes à l'origine de la maladie suggère fortement qu'elles ont un rôle physiopathologique propre. On ne connaît toutefois pas leur fonctionnalité dans ce tissu, mais la capacité des NK à exprimer Granzyme B, associés aux mécanismes physiopathologiques décrits comme étant à l'origine du Syndrome des Antisynthétases au niveau pulmonaire [220], souligne que les cellules NK pourraient avoir un rôle dans l'initiation et l'entretien de la réponse immune (clivage des ARNt synthétases les rendant immunogènes). Cependant, leur rôle dans la génèse de la fibrose pulmonaire elle-même est peu documenté, ni au cours du Syndrome des Antisynthétases, ni dans des contextes cliniques proches, comme la sclérodermie systémique, la fibrose pulmonaire idiopathique ou même la sarcoïdose [295,296],

granulomatose systémique pouvant conduire à la fibrose pulmonaire. Les résultats immunohistochimiques présentés ici (*Résultats 4*) montrent toutefois l'importance du contingent de cellules inflammatoires, attesté par la présence de lymphocytes T, B et NK, à un stade tardif de l'évolution de la fibrose pulmonaire (immunohistochimies réalisées sur des poumons explantés). Ceci témoigne de l'entretien prolongé des phénomènes immunitaires tout au long de la maladie.

Afin de mieux apprécier les mécanismes mettant en jeu les cellules NK au cours du Syndrome des Antisynthétases, il pourrait être intéressant d'étudier les phénomènes d'ADCC en présence de cibles ayant fixé les auto-anticorps des patients (cellules RAJI en présence des auto-anticorps purifiés par colonne de chromatographie à partir du serum des patients) mais également l'implication directe de NKp30, en étudiant l'effet d'anticorps anti-NKp30 (fragment Fab'2) sur les fonctions des cellules NK. De plus, des cultures de myocytes (mise en culture des biopsies musculaires de patients) en présence de cellules NK autologues pourraient permettre d'étudier *in vitro* le rôle effecteur potentiel des cellules NK contre ces cibles « physiologiques ».

2. Hypothèses concernant les différences phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK au cours du Lupus Systémique et du Syndrome des Antisynthétases

Comme abordé en *Introduction*, les phénomènes à l'origine de l'auto-immunité (ou de la rupture de la tolérance au soi) sont multiples et très complexes. En dehors de rares cas d'origine monogénique, l'immunopathologie des maladies auto-immunes systémiques relève de nombreux mécanismes et fait souvent appel à l'ensemble des acteurs de l'immunité innée et adaptative. Pour aboutir dans les organes à un ensemble de lésions délétères, il apparaît que les différentes cellules immunitaires co-interagissent entre elles ainsi qu'avec l'environnement tissulaire, à travers des mécanismes interdépendants et dont les étapes sont savamment orchestrées.

Si on envisage que les cellules NK agissent en interactions avec d'autres cellules immunitaires, il est intéressant de constater que leurs modulations phénotypiques sont différentes au cours du Syndrome des Antisynthétases et du Lupus Systémique. De plus, ces anomalies ne semblent pas non plus équivalentes à celles décrites au cours de

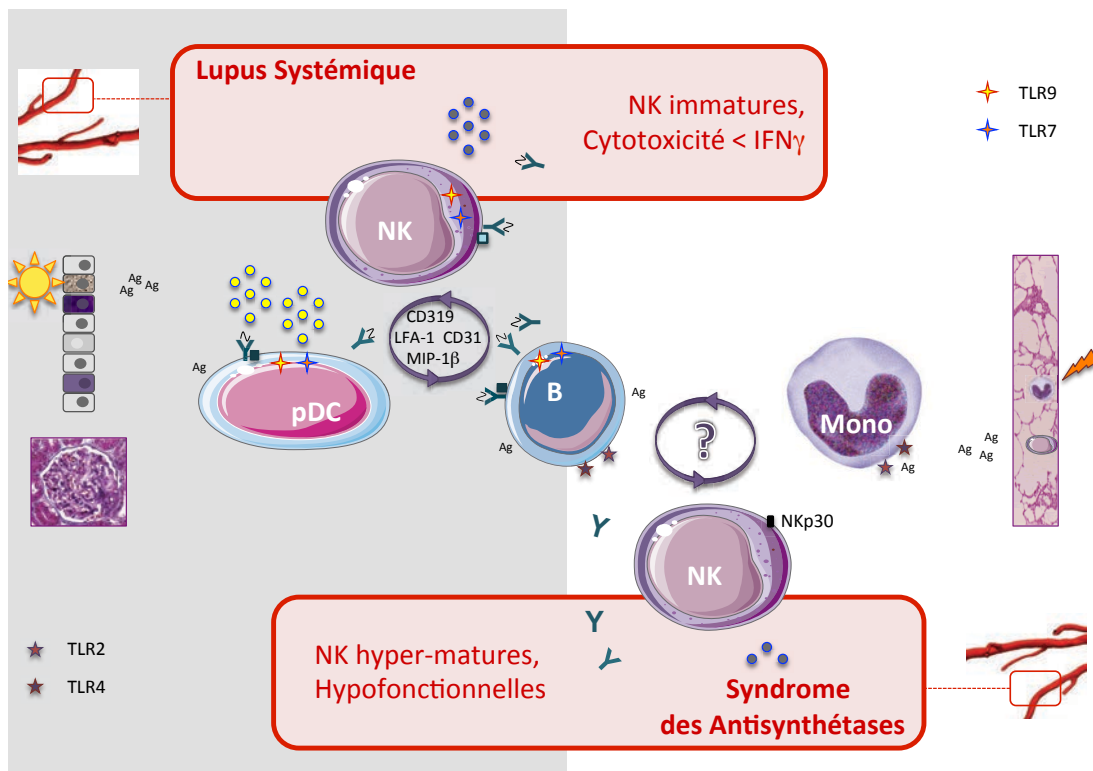


Figure 13 : Hypothèses concernant les interactions cellulaires à l'origine des anomalies des cellules NK circulantes observées au cours du Lupus Systémique et du Syndrome des Antisynthétases

Hypothèse d'un « ménage à trois » entre cellules dendritiques, Lymphocytes B (B) et cellules NK au cours des maladies auto-immunes. Au cours du Lupus Systémique, l'activation conjointe des cellules dendritiques plasmacytoides (pDCs) et des deux autres acteurs via TLR7 et TLR9 et des interactions cellules-cellules dans les tissus cibles aboutirait à ce que dans le sang les cellules NK aient un phénotype NK immature. Au cours du Syndrome des Antisynthétases, le recrutement dans les organes cibles comme le poumon de monocytes (mono) et de cellules dendritiques myéloïdes et leur activation via TLR2 et TLR4 quant à elle, aboutirait à des cellules NK dans le compartiment sanguin avec un phénotype hypermature mais des fonctions diminuées.

syndrome de Gougerot-Sjögren [276]. L'impact d'une réponse auto-immune sur les cellules NK comme l'impact des cellules NK sur le reste du système immunitaire ne serait donc pas équivalent dans toutes les maladies auto-immunes systémiques.

Il est de même intéressant de mettre en opposition les phénomènes initiateurs du Lupus Systémique avec ceux du Syndrome des Antisynthétases. En effet, le Lupus Systémique semble débiter par l'activation des pDCs qui s'opère via TLR7 et TLR9, qui sont nombreuses au sein des tissus affectées au cours du Lupus comme la peau ou le rein [297]. Dans un modèle murin, le Syndrome des Antisynthétases est quant à lui inductible par le biais de la stimulation des cellules de la lignée monocyttaire (cellules dendritiques myéloïdes, monocytes et macrophages) via TLR2 et TLR4 [223], qui sont les principales populations cellulaires immunitaires présentes dans les alvéoles pulmonaires. Au cours de ces deux maladies auto-immunes, les lymphocytes B sont au centre de la réponse auto-immune à travers la production des auto-anticorps. On remarquera qu'ils ont la capacité d'être stimulés aussi bien par les auto-antigènes du Lupus Systémique que ceux du Syndrome des Antisynthétases puisqu'ils expriment à la fois TLR2, 4, 7, et 9 et pourraient ainsi s'activer dans les deux cas. Par contre, les cellules NK ne peuvent recevoir de signaux activateurs directs que dans le cadre du Lupus Systémique, car elles expriment TLR7 et TLR9 mais n'expriment pas TLR2 et TLR4, qui sont impliqués dans le Syndrome des Antisynthétases. De plus, les cellules NK pourraient recevoir des signaux de co-activation différents provenant de lymphocytes B activés, de pDCs ou de mDcs selon la maladie auto-immune considérée. Ces différences concernant l'activation initiale (puis entretenue) de l'immunité tissulaire pourraient expliquer les modulations observées au niveau des phénotypes et des fonctionnalités des cellules NK circulantes au cours du Lupus Systémique et du Syndrome des Antisynthétases.

L'ensemble de ces données immunopathogéniques, largement hypothétique, est résumé dans la *Figure 13*.

3. Perspectives

A partir des données concernant les cellules NK rapportées dans ce mémoire, des applications particulières en recherche clinique et thérapeutique semblent envisageables. De plus, dans la mesure où l'implication des cellules NK au cours des

maladies auto-immunes requiert d'autres partenaires du système immunitaire et de nombreuses interactions cellulaires, de vastes études immunologiques analysant les anomalies des cellules NK en parallèle de celles d'autres types cellulaires également impliqués seraient très informatives. L'ensemble de ces investigations est représenté *Figure 14*.

3.1. Intérêt de la poursuite de l'étude des cellules NK –isolément- au cours des maladies auto-immunes

Au delà de l'approfondissement de la connaissance des mécanismes impliquant les cellules NK au cours des maladies auto-immunes, il paraît intéressant de poursuivre certaines explorations à des fins de recherche translationnelle. En effet, certains résultats présentés dans ce mémoire pourraient trouver différentes applications.

3.1.1. Développement de biomarqueurs

Les anomalies des cellules NK qui corréleront fortement avec l'activité des maladies auto-immunes étudiées sont nombreuses. Il est par exemple possible, comme cela est montré au moyen d'une courbe ROC (*Résultats 4*), de proposer au cours du Syndrome des Antisynthétases un test biologique incluant pour variables les proportions respectives de cellules NK positives pour NKp30, CD57 et ILT2. Ce test diagnostique permet de prédire l'activité de la maladie avec une bonne validité. De même, d'autres paramètres, comme le niveau d'expression de TLR9 ou la production d'IFN γ par les cellules NK stimulées par IL12 et IL18 pourraient également être prédictifs de l'activité du Lupus Systémique. Toutefois pour ces deux maladies, l'activité est évaluable cliniquement et d'autres tests sérologiques validés sont déjà utilisés pour évaluer leur degré d'activité biologique. L'apport de tests spécifiques aux cellules NK paraît donc pour le moment limité pour la pratique courante.

Ces tests biologiques pourraient éventuellement être utilisées à des fins d'évaluation de la sévérité ou du pronostic de la maladie auto-immune. Cependant, les résultats présentés dans ce travail ne permettent pas de valider ce type d'approche, puisque il n'a notamment pas été réalisé de suivi longitudinal des patients et le nombre

de patients est trop restreint. Des études complémentaires devraient donc être envisagées.

Il semblerait en revanche plus intéressant d'utiliser ces tests à des fins d'évaluation d'une réponse à différentes thérapeutiques. En effet de nombreuses thérapies ciblées sont en développement pour les maladies auto-immunes actuellement, mais la place de ces dernières reste difficilement évaluable à l'échelle individuelle. Optimiser la prescription de ces biothérapies, souvent coûteuses et non dénuées d'effets secondaires, à l'aide de tests pré-thérapeutiques simples pourrait être une application des résultats présentés dans ce mémoire. Des anticorps anti-IFN γ sont par exemple testés actuellement pour les patients atteints de Lupus Systémique (essai de phase I). On peut postuler que l'efficacité de ces derniers sera plus importante chez les patients produisant de forts taux de cette cytokine et tenter de valider un test pré-thérapeutique prédictif de la réponse au traitement basé sur l'évaluation individuelle de la production de cette cytokine par les cellules NK. De même, il existe actuellement d'intenses recherches visant à développer des molécules ciblant les TLRs, dont TLR9 [298–300]. De telles molécules pourraient aisément être testés à l'échelle individuelle *in vitro* sur les PBMCs ou les cellules NK des patients, avant de décider de leur prescription.

3.1.2. Développement de nouvelles thérapies ciblées

Poursuivre l'étude des mécanismes impliquant les cellules NK au cours des maladies auto-immunes, notamment lorsqu'a été mise en évidence l'implication d'un récepteur en particulier, comme cela semble être le cas au cours du Syndrome de Gougerot-Sjögren ou même au cours du Syndrome des Antisynthétase avec le NKp30, peut permettre d'approfondir la connaissance du fonctionnement d'une voie d'activation en particulier. Ce type d'approche vise aussi le développement à terme de nouvelles thérapies ciblées, comme par exemple des anticorps anti-NKp30 qui sont aussi en développement actuellement. De même, une meilleure connaissance de la voie du TLR9, de ses modes d'activation et de sa régulation dans les différents types cellulaires qui l'expriment, pourrait aider au développement de traitements spécifiques [298,299].

3.2. Etudes en parallèle de différents acteurs immunologiques impliqués dans l'immunopathologie des maladies auto-immunes.

La complexité de l'immunopathologie des maladies auto-immunes est peut-être un avantage si l'on souhaite étudier le fonctionnement global du système immunitaire ou analyser un réseau cellulaire en particulier. Si elles étaient informatives, de telles analyses pourraient non seulement aider à la prise en charge individuelle des patients mais également à la compréhension des interactions des cellules immunitaires entre elles.

3.2.1. Vers une médecine personnalisée

Les maladies auto-immunes, comme le Lupus Systémique et le Syndrome des Antisynthétases (*Annexe 4*) sont des maladies cliniquement hétérogènes. L'existence de certaines atteintes d'organes mises à part, il est individuellement difficile de prévoir au moment du diagnostic où à des moments clés de l'évolution de la maladie quel est le pronostic de chaque patient. Des études de cohortes ont tenté, à l'aide des données cliniques et sérologiques, de définir par des techniques d'analyses multivariées de type clustering hiérarchique [120,121,211] des sous-groupes de patients ayant des pronostics différents. Cependant ces études ne permettent pas de discriminer suffisamment les patients avec un bon ou un moins bon pronostic, au point de proposer une prise en charge médicale adaptée à chaque profil. Coupler les données cliniques et sérologiques avec des analyses immunologiques, telles que l'expression de TLR7 et TLR9 [301] pourrait probablement permettre d'affiner l'identification des sous-groupes de patients à risque. Dans cet objectif, il semble intéressant d'inclure les anomalies phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK. Il serait probablement plus relevant d'étudier les paramètres immunologiques ensembles, comprenant les autres cellules impliquées dans la physiopathologie des maladies auto-immunes, comme les cellules dendritiques ou les lymphocytes B qui semblent impliquées dans les mêmes phases de la réponse immunitaire. Une telle approche nécessite l'inclusion de nombreux patients affectés par des maladies rares et devrait donc être réalisée à l'échelle multicentrique.

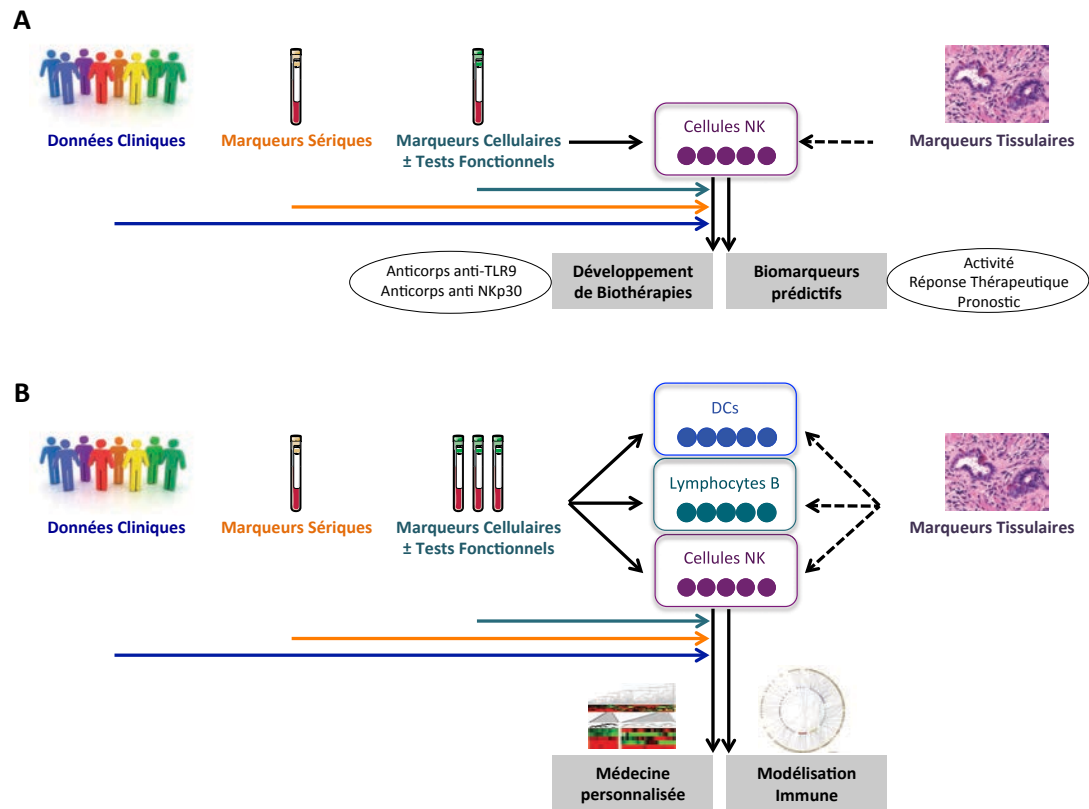


Figure 14 : Propositions d'application en recherche fondamentale, translationnelle et clinique à partir de l'étude des cellules NK au cours des Maladies auto-immunes.

A. Poursuite de l'étude des cellules NK individuellement, à des fins de recherche clinique et thérapeutique. **B.** Etudes concomitantes des cellules NK avec d'autres cellules immunitaires impliquées dans les phases initiales de la réponse immune au cours des maladies auto-immunes, à des fins de personnalisation de prise en charge médicale et de modélisation de la réponse immune à l'échelle cellulaire (et/ou tissulaire).

On peut postuler que de telles analyses permettraient de définir de nouveaux sous-groupes de patients présentant des anomalies immunologiques similaires, et de les identifier comme risquant d'évoluer favorablement ou défavorablement. Sur la base de ces analyses, l'efficacité potentielle de tel ou tel traitement ciblant des voies immunologiques particulières pourrait être plus spécifiquement identifiée. L'objectif étant finalement de proposer, comme est le cas pour la prise en charge des patients en oncologie, une médecine personnalisée, intégrant ces données immunologiques et permettant d'adapter la prise en charge thérapeutique au cas par cas.

3.2.2. Vers une modélisation de la réponse immunitaire au cours des maladies auto-immunes

Le système immunitaire est un vaste système biologique dont la complexité permet de répondre aux qualités principales de diversité, d'adaptation, de fiabilité et d'efficacité etc... La compréhension des phénomènes immunitaires peut se faire à plusieurs niveaux. A un niveau expérimental, comme rapporté ici, il est possible de mettre en évidence certains phénomènes particuliers. Mais rapidement, leur interprétation est rendue difficile du fait de la complexité des mécanismes qui sont mis en jeu et l'existence de plusieurs niveaux d'organisation (moléculaire, cellulaire et tissulaire). A partir de différentes données expérimentales, l'analyse d'un système biologique peut aussi se faire par modélisations mathématiques et statistiques, qui nécessitent des étapes de simulation, de formulation de nouvelles hypothèses et de nouvelles vérifications expérimentales afin d'être validées [302,303]. De nombreuses approches sont possibles, basées sur différents algorithmes et théories mathématiques, pour rendre compte de la dynamique des interactions cellulaires à l'échelle d'un système biologique, comme cela a été proposé pour le système immunitaire au cours de l'étude de la réponse immune anti-tumorale [303,304], de la génération d'un répertoire lymphocytaire mémoire [305] ou encore de l'homéostasie lymphocytaire...

L'objet de telles modélisations est de faire émerger, à partir de données individuelles même incomplètement comprises, les propriétés globales d'un système [303], en l'occurrence celles qui concourent à la rupture de tolérance au soi. Au cours des maladies auto-immunes, l'analyse simultanée d'un grand nombre de variables inter-dépendantes, concernant plusieurs types cellulaires interagissant entre eux et impliqués aux mêmes phases de la réponse immunitaire, pourrait ainsi permettre, à

l'aide d'algorithmes adaptés (déterminés avec le concours de biophysiciens), de mieux cerner la dynamique du réseau immunitaire à l'origine de l'auto-immunité. En effet, les maladies auto-immunes, qui sont des pathologies chroniques au cours desquelles les interactions cellulaires sont multiples et réciproques et la stimulation par les auto-antigènes est prolongée et aisément évaluable qualitativement et quantitativement, semblent se prêter à ce type d'analyses [306,307]. De plus, plusieurs niveaux d'analyse sont possibles : moléculaire, cellulaire mais aussi tissulaire puisqu'au cours de ces maladies, des prélèvements biopsiques sont fréquemment réalisées à des fins diagnostiques ou pronostiques.

Pour voir le jour toutefois, une telle étude, qui requiert un grand nombre de patients avec éventuellement un suivi longitudinal ainsi que plusieurs équipes de recherche en immunologie, ne pourra être envisagée qu'à travers un projet d'envergure, multicentrique, dans le cadre d'un « appel à projet » sinon européen au moins national.

V. Conclusion

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire suggère que les cellules NK interviennent dans l'immunopathologie de certaines maladies auto-immunes systémiques. Les cellules NK circulantes présentent des anomalies phénotypiques et fonctionnelles qui corrèlent avec l'activité de la maladie, tandis qu'elles sont proches des sujets contrôles dans les phases de rémission. Ces anomalies observées ne sont pas identiques selon la maladie auto-immune étudiée.

Ceci suggère qu'au cours du Lupus Systémique et du Syndrome des Antisynthétases les cellules NK répondent à des événements externes, plutôt qu'elles ne les engendrent elles-mêmes du fait de déficiences intrinsèques.

Les conséquences des anomalies des cellules NK observées au cours des maladies auto-immunes restent mal comprises. Ceci devra faire l'objet d'études spécifiques, notamment au niveau tissulaire, le compartiment sanguin ne reflétant qu'imparfaitement l'environnement tissulaire où a lieu la réponse immunitaire.

VI. Références

- [1] **Kiessling R**, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975;5:117–21.
- [2] **Robertson MJ**, Caligiuri MA, Manley TJ, Levine H, Ritz J. Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytolysis. *J Immunol Baltim Md* 1950 1990;145:3194–201.
- [3] **Sojka DK**, Tian Z, Yokoyama WM. Tissue-resident natural killer cells and their potential diversity. *Semin Immunol* 2014;26:127–31.
- [4] **Shi F-D**, Ljunggren H-G, La Cava A, Van Kaer L. Organ-specific features of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 2011;11:658–71.
- [5] **Cooper MA**, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633–40.
- [6] **Béziat V**, Duffy D, Quoc SN, Le Garff-Tavernier M, Decocq J, Combadière B, et al. CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. *J Immunol Baltim Md* 1950 2011;186:6753–61.
- [7] **Vivier E**, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331:44–9.
- [8] **Vivier E**, Ugolini S, Nunès JA. ADAPted secretion of cytokines in NK cells. *Nat Immunol* 2013;14:1108–10.
- [9] **Pradeu T**, Jaeger S, Vivier E. The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? *Nat Rev Immunol* 2013;13:764–9.
- [10] **Sivori S**, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Vitale M, Marcenaro E. TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol* 2014;5:105.
- [11] **Moretta A**, Vitale M, Bottino C, Orengo AM, Morelli L, Augugliaro R, et al. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 1993;178:597–604.
- [12] **Colonna M**, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 1995;268:405–8.
- [13] **Lanier LL**, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998;391:703–7.
- [14] **Kulkarni S**, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol* 2008;20:343–52.
- [15] **Kärre K**, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675–8.
- [16] **Joyce MG**, Sun PD. The structural basis of ligand recognition by natural killer cell receptors. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:203628.
- [17] **Valés-Gómez M**, Reyburn HT, Mandelboim M, Strominger JL. Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors. *Immunity* 1998;9:337–44.
- [18] **Le Page MEL**, Goodridge JP, John E, Christiansen FT, Witt CS. Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN- γ responses to soluble HLA-G preparations. *J Immunol Baltim Md* 1950 2014;192:732–40.
- [19] **Rajagopalan S**, Long EO. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Front Immunol* 2012;3:258.
- [20] **Momot T**, Schmidt RE, Witte T. Regulation of killer immunoglobulin-like receptors in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2006;33:1029.
- [21] **Pellett F**, Siannis F, Vukin I, Lee P, Urowitz MB, Gladman DD. KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma. *Tissue Antigens* 2007;69 Suppl 1:106–8.
- [22] **Anderson P**, Caligiuri M, O'Brien C, Manley T, Ritz J, Schlossman SF. Fc gamma receptor type III (CD16) is included in the zeta NK receptor complex expressed by human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2274–8.
- [23] **Nagler A**, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 1989;143:3183–91.
- [24] **Guilliams M**, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* 2014;14:94–108.
- [25] **Cosman D**, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, et al. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997;7:273–82.
- [26] **Gumá M**, Angulo A, López-Botet M. NK cell receptors involved in the response to human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:207–23.
- [27] **Kruse PH**, Matta J, Ugolini S, Vivier E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol* 2014;92:221–9.
- [28] **Delahaye NF**, Rusakiewicz S, Martins I, Ménard C, Roux S, Lyonnet L, et al. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med* 2011;17:700–7.
- [29] **Baychelier F**, Sennepin A, Ermonval M, Dorgham K, Debré P, Vieillard V. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood* 2013;122:2935–42.
- [30] **Kaifu T**, Escalière B, Gastinel LN, Vivier E, Baratin M. B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2011;68:3531–9.
- [31] **Shibuya A**, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 1996;4:573–81.
- [32] **Bottino C**, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 2003;198:557–67.
- [33] **Chan CJ**, Andrews DM, McLaughlin NM, Yagita H, Gilfillan S, Colonna M, et al. DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J Immunol Baltim Md* 1950 2010;184:902–11.
- [34] **Pende D**, Castriconi R, Romagnani P, Spaggiari GM, Marcenaro S, Dondero A, et al. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 2006;107:2030–6.

- [35] **Lazetic S**, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol Baltim Md* 1950 1996;157:4741–5.
- [36] **Braud VM**, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998;391:795–9.
- [37] **Braud V**, Jones EY, McMichael A. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol* 1997;27:1164–9.
- [38] **Lee N**, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol Baltim Md* 1950 1998;160:4951–60.
- [39] **Bennett IM**, Zatzepina O, Zamai L, Azzoni L, Mikheeva T, Perussia B. Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. *J Exp Med* 1996;184:1845–56.
- [40] **Aldemir H**, Prod'homme V, Dumaourier M-J, Retiere C, Poupon G, Cazareth J, et al. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol Baltim Md* 1950 2005;175:7791–5.
- [41] **Rosen DB**, Bettadapura J, Alsharifi M, Mathew PA, Warren HS, Lanier LL. Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J Immunol Baltim Md* 1950 2005;175:7796–9.
- [42] **Montaldo E**, Vitale C, Cottalasso F, Conte R, Glatzer T, Ambrosini P, et al. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood* 2012;119:3987–96.
- [43] **Germain C**, Bihl F, Zahn S, Poupon G, Dumaourier M-J, Rampanarivo HH, et al. Characterization of alternatively spliced transcript variants of CLEC2D gene. *J Biol Chem* 2010;285:36207–15.
- [44] **Germain C**, Meier A, Jensen T, Knapnougel P, Poupon G, Lazzari A, et al. Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon- γ contributes to modulate immune responses. *J Biol Chem* 2011;286:37964–75.
- [45] **Rosen DB**, Cao W, Avery DT, Tangye SG, Liu Y-J, Houchins JP, et al. Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2008;180:6508–17.
- [46] **Kusumi M**, Yamashita T, Fujii T, Nagamatsu T, Kozuma S, Taketani Y. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol* 2006;70:33–42.
- [47] **Béziat V**, Liu LL, Malmberg J-A, Ivarsson MA, Sohlberg E, Björklund AT, et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 2013;121:2678–88.
- [48] **Hendricks DW**, Balfour HH Jr, Dunmire SK, Schmeling DO, Hogquist KA, Lanier LL. Cutting Edge: NKG2ChiCD57+ NK Cells Respond Specifically to Acute Infection with Cytomegalovirus and Not Epstein-Barr Virus. *J Immunol Baltim Md* 1950 2014.
- [49] **Bauer S**, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285:727–9.
- [50] **Huergo-Zapico L**, Acebes-Huerta A, López-Soto A, Villa-Álvarez M, Gonzalez-Rodriguez AP, Gonzalez S. Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer. *Front Immunol* 2014;5:106.
- [51] **Guerra N**, Pestal K, Juarez T, Beck J, Tkach K, Wang L, et al. A selective role of NKG2D in inflammatory and autoimmune diseases. *Clin Immunol Orlando Fla* 2013;149:432–9.
- [52] **Maghazachi AA**. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;341:37–58.
- [53] **Nguyen KB**, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei X, Liew FY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN- α β , IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol Baltim Md* 1950 2002;169:4279–87.
- [54] **Biron CA**, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999;17:189–220.
- [55] **Rönnblom L**. The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases. *Ups J Med Sci* 2011;116:227–37.
- [56] **Medzhitov R**, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91:295–8.
- [57] **Richez C**, Blanco P, Rifkin I, Moreau J-F, Schaefferbeke T. Role for toll-like receptors in autoimmune disease: the example of systemic lupus erythematosus. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2011;78:124–30.
- [58] **Blasius AL**, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010;32:305–15.
- [59] **Latz E**, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004;5:190–8.
- [60] **Della Chiesa M**, Marcenaro E, Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A. Human NK cell response to pathogens. *Semin Immunol* 2014;26:152–60.
- [61] **Akira S**, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499–511.
- [62] **Brenchley JM**, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 2003;101:2711–20.
- [63] **Lopez-Vergés S**, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, et al. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:14725–32.
- [64] **Nielsen CM**, White MJ, Goodier MR, Riley EM. Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Front Immunol* 2013;4:422.
- [65] **Nguyen S**, Dhedin N, Vernant J-P, Kuentz M, Al Jijakli A, Rouas-Freiss N, et al. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* 2005;105:4135–42.
- [66] **Luetke-Eversloh M**, Killig M, Romagnani C. Signatures of Human NK Cell Development and Terminal Differentiation. *Front Immunol* 2013;4:499.

- [67] **Edwards JCW**, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004;350:2572–81.
- [68] **Cullen SP**, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* 2008;15:251–62.
- [69] **Thorburn A**. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 2004;16:139–44.
- [70] **Chávez-Galán L**, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascrain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009;6:15–25.
- [71] **Declercq W**, Denecker G, Fiers W, Vandenabeele P. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol Baltim Md* 1950 1998;161:390–9.
- [72] **Schroder K**, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163–89.
- [73] **Chiche L**, Jourde-Chiche N, Whalen E, Presnell S, Gersuk V, Dang K, et al. Modular Transcriptional Repertoire Analyses of Adults With Systemic Lupus Erythematosus Reveal Distinct Type I and Type II Interferon Signatures. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2014;66:1583–95.
- [74] **Hall JC**, Casciola-Rosen L, Berger AE, Kapsogeorgou EK, Cheadle C, Tzioufas AG, et al. Precise probes of type II interferon activity define the origin of interferon signatures in target tissues in rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:17609–14.
- [75] **Yuan D**. Interactions between NK cells and B lymphocytes. *Adv Immunol* 2004;84:1–42.
- [76] **Zingoni A**, Ardolino M, Santoni A, Cerboni C. NKG2D and DNAM-1 activating receptors and their ligands in NK-T cell interactions: role in the NK cell-mediated negative regulation of T cell responses. *Front Immunol* 2012;3:408.
- [77] **Jaeger BN**, Donadieu J, Cognet C, Bernat C, Ordoñez-Rueda D, Barlogis V, et al. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med* 2012;209:565–80.
- [78] **Kloss M**, Decker P, Baltz KM, Baessler T, Jung G, Rammensee H-G, et al. Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA. *J Immunol Baltim Md* 1950 2008;181:6711–9.
- [79] **Schulz U**, Kreutz M, Multhoff G, Stoelcker B, Köhler M, Andreesen R, et al. Interleukin-10 promotes NK cell killing of autologous macrophages by stimulating expression of NKG2D ligands. *Scand J Immunol* 2010;72:319–31.
- [80] **Nedvetzki S**, Sowinski S, Eagle RA, Harris J, Vély F, Pende D, et al. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 2007;109:3776–85.
- [81] **Gerosa F**, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, et al. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol Baltim Md* 1950 2005;174:727–34.
- [82] **Bajénoff M**, Breart B, Huang AYC, Qi H, Cazareth J, Braud VM, et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 2006;203:619–31.
- [83] **Ferlazzo G**, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16606–11.
- [84] **Piccioli D**, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002;195:335–41.
- [85] **Vitale M**, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Aricò M, Moretta L, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the Nkp30 triggering receptor. *Blood* 2005;106:566–71.
- [86] **Vitale M**, Della Chiesa M, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, et al. The small subset of CD56brightCD16-natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004;34:1715–22.
- [87] **Marcenaro E**, Cantoni C, Pesce S, Prato C, Pende D, Agaogué S, et al. Uptake of CCR7 and acquisition of migratory properties by human KIR+ NK cells interacting with monocyte-derived DC or EBV cell lines: regulation by KIR/HLA-class I interaction. *Blood* 2009;114:4108–16.
- [88] **Ferlazzo G**, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002;195:343–51.
- [89] **Spaggiari GM**, Carosio R, Pende D, Marcenaro S, Rivera P, Zocchi MR, et al. NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors Nkp30 and Nkp46. *Eur J Immunol* 2001;31:1656–65.
- [90] **Lucas M**, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 2007;26:503–17.
- [91] **Morandi B**, Mortara L, Chiossone L, Accolla RS, Mingari MC, Moretta L, et al. Dendritic cell editing by activated natural killer cells results in a more protective cancer-specific immune response. *PLoS One* 2012;7:e39170.
- [92] **Salinas GF**, Braza F, Brouard S, Tak P-P, Baeten D. The role of B lymphocytes in the progression from autoimmunity to autoimmune disease. *Clin Immunol Orlando Fla* 2013;146:34–45.
- [93] **Goodnow CC**. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell* 2007;130:25–35.
- [94] **Waterfield M**, Anderson MS. Clues to immune tolerance: the monogenic autoimmune syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1214:138–55.
- [95] **Schwartz RH**. Historical overview of immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a006908.
- [96] **Nagamine K**, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 1997;17:393–8.
- [97] **Stahl D**, Lacroix-Desmazes S, Heudes D, Mouthon L, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Altered control of self-reactive IgG by autologous IgM in patients with warm autoimmune hemolytic anemia. *Blood* 2000;95:328–35.
- [98] **Luning Prak ET**, Monestier M, Eisenberg RA. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1217:96–121.
- [99] **Wahren-Herlenius M**, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet* 2013;382:819–31.
- [100] **Zouali M**. Receptor editing and receptor revision in rheumatic autoimmune diseases. *Trends Immunol* 2008;29:103–9.
- [101] **Kuwabara S**, Yuki N. Axonal Guillain-Barré syndrome: concepts and controversies. *Lancet Neurol* 2013;12:1180–8.

- [102] **D'Arena G**, Guariglia R, La Rocca F, Trino S, Condelli V, De Martino L, et al. Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:730131.
- [103] **Mihai S**, Nimmerjahn F. The role of Fc receptors and complement in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2013;12:657–60.
- [104] **Bonnotte B**. [Pathogenic mechanisms of autoimmune diseases]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne* 2004;25:648–58.
- [105] **Bennett CL**, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–1.
- [106] **Miyara M**, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol Baltim Md* 1950 2005;175:8392–400.
- [107] **Price S**, Shaw PA, Seitz A, Joshi G, Davis J, Niemela JE, et al. Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood* 2014;123:1989–99.
- [108] **Rieux-Laucat F**, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268:1347–9.
- [109] **Bareau B**, Rey J, Hamidou M, Donadieu J, Morcet J, Reman O, et al. Analysis of a French cohort of patients with large granular lymphocyte leukemia: a report on 229 cases. *Haematologica* 2010;95:1534–41.
- [110] **Harrington LE**, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123–32.
- [111] **Park H**, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133–41.
- [112] **Yang J**, Chu Y, Yang X, Gao D, Zhu L, Yang X, et al. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;60:1472–83.
- [113] **Díaz-Peña R**, Vidal-Castiñeira JR, Alonso-Arias R, Suarez-Alvarez B, Vicario JL, Solana R, et al. Association of the KIR3DS1*013 and KIR3DL1*004 alleles with susceptibility to ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2010;62:1000–6.
- [114] **Martin MP**, Nelson G, Lee J-H, Pellett F, Gao X, Wade J, et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol Baltim Md* 1950 2002;169:2818–22.
- [115] **Goulvestre C**. [Antinuclear antibodies]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983 2006;35:287–95.
- [116] **Lim SS**, Bayakly AR, Helmick CG, Gordon C, Easley KA, Drenkard C. The Incidence and Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus, 2002–2004: The Georgia Lupus Registry. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:357–68.
- [117] **Somers EC**, Marder W, Cagnoli P, Lewis EE, DeGuire P, Gordon C, et al. Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: the Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance program. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ 2014;66:369–78.
- [118] **Rahman A**, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2008;358:929–39.
- [119] **Petri M**, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012;64:2677–86.
- [120] **Ching KH**, Burbelo PD, Tipton C, Wei C, Petri M, Sanz I, et al. Two major autoantibody clusters in systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 2012;7:e32001.
- [121] **To CH**, Petri M. Is antibody clustering predictive of clinical subsets and damage in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Rheum* 2005;52:4003–10.
- [122] **Mathian A**, Arnaud L, Amoura Z. [Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: A 2014 update.]. *Rev Med Interne Fondée Par Soc Natl Française Med Interne* 2013.
- [123] **Tsokos GC**. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011;365:2110–21.
- [124] **Arbuckle MR**, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349:1526–33.
- [125] **Buyon JP**, Petri MA, Kim MY, Kalunian KC, Grossman J, Hahn BH, et al. The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2005;142:953–62.
- [126] **Li X**, Xu Y, Ma L, Sun L, Fu G, Hou Y. 17beta-estradiol enhances the response of plasmacytoid dendritic cell to CpG. *PLoS One* 2009;4:e8412.
- [127] **James JA**, Robertson JM. Lupus and Epstein-Barr. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:383–8.
- [128] **McClain MT**, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Harley JB, James JA. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med* 2005;11:85–9.
- [129] **Nielsen CT**, Østergaard O, Johnsen C, Jacobsen S, Heegaard NHH. Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2011;63:3067–77.
- [130] **Pisetsky DS**, Gauley J, Ullal AJ. Microparticles as a source of extracellular DNA. *Immunol Res* 2011;49:227–34.
- [131] **Lindau D**, Mussard J, Rabsteyn A, Ribon M, Köttler I, Igney A, et al. TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Ann Rheum Dis* 2013.
- [132] **Tas SW**, Quartier P, Botto M, Fossati-Jimack L. Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. *Ann Rheum Dis* 2006;65:216–21.
- [133] **Ganguly D**, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:566–77.
- [134] **Sule S**, Rosen A, Petri M, Akhter E, Andrade F. Abnormal production of pro- and anti-inflammatory cytokines by lupus monocytes in response to apoptotic cells. *PLoS One* 2011;6:e17495.
- [135] **Blanco P**, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001;294:1540–3.
- [136] **Dörner T**, Giesecke C, Lipsky PE. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis Res Ther* 2011;13:243.
- [137] **Hahn BH**. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 1998;338:1359–68.

- [138] **Moser KL**, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2009;10:373–9.
- [139] **Blanco P**, Pitard V, Viallard J-F, Taupin J-L, Pellegrin J-L, Moreau J-F. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:201–11.
- [140] **Chang N-H**, McKenzie T, Bonventi G, Landolt-Marticorena C, Fortin PR, Gladman D, et al. Expanded population of activated antigen-engaged cells within the naive B cell compartment of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Baltim Md 1950* 2008;180:1276–84.
- [141] **Henault J**, Martinez J, Riggs JM, Tian J, Mehta P, Clarke L, et al. Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity* 2012;37:986–97.
- [142] **Lee BL**, Barton GM. Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends Cell Biol* 2014.
- [143] **Kuhn A**, Wenzel J, Weyd H. Photosensitivity, Apoptosis, and Cytokines in the Pathogenesis of Lupus Erythematosus: a Critical Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014.
- [144] **Gaipl US**, Munoz LE, Grossmayer G, Lauber K, Franz S, Sarter K, et al. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun* 2007;28:114–21.
- [145] **Nagata S**, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 2010;140:619–30.
- [146] **Muñoz LE**, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:280–9.
- [147] **Mevorach D**. Clearance of dying cells and systemic lupus erythematosus: the role of C1q and the complement system. *Apoptosis Int J Program Cell Death* 2010;15:1114–23.
- [148] **Navratil JS**, Watkins SC, Wisniewski JJ, Ahearn JM. The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2001;166:3231–9.
- [149] **Korb LC**, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol Baltim Md 1950* 1997;158:4525–8.
- [150] **Bouts YM**, Wolthuis DFGJ, Dirkx MFM, Pieterse E, Simons EMF, van Boekel AM, et al. Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. *Autoimmunity* 2012;45:597–601.
- [151] **Crow YJ**. Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1238:91–8.
- [152] **Celhar T**, Magalhães R, Fairhurst A-M. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunol Res* 2012;53:58–77.
- [153] **Barrat FJ**, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005;202:1131–9.
- [154] **Hurtado P**, Peh CA. LL-37 promotes rapid sensing of CpG oligodeoxynucleotides by B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2010;184:1425–35.
- [155] **Means TK**, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 2005;115:407–17.
- [156] **Lande R**, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3:73ra19.
- [157] **Roberts TL**, Turner ML, Dunn JA, Lenert P, Ross IL, Sweet MJ, et al. B cells do not take up bacterial DNA: an essential role for antigen in exposure of DNA to toll-like receptor-9. *Immunol Cell Biol* 2011;89:517–25.
- [158] **Baccala R**, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* 2007;13:543–51.
- [159] **Decker P**, Singh-Jasuja H, Haager S, Köttler I, Rammensee H-G. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950* 2005;174:3326–34.
- [160] **Boulé MW**, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med* 2004;199:1631–40.
- [161] **Bernasconi NL**, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003;101:4500–4.
- [162] **Bernasconi NL**, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 2002;298:2199–202.
- [163] **Viglianti GA**, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* 2003;19:837–47.
- [164] **Garcia-Romo GS**, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3:73ra20.
- [165] **Gilliet M**, Cao W, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;8:594–606.
- [166] **Lande R**, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y-H, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007;449:564–9.
- [167] **Ma C**, Jiao Y, Zhang J, Yang Q, Zhang Z, Shen Y, et al. Elevated plasma level of HMGB1 is associated with disease activity and combined alterations with IFN- α and TNF- α in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2012;32:395–402.
- [168] **Kawai T**, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373–84.
- [169] **Obermoser G**, Pascual V. The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2010;19:1012–9.
- [170] **Hervas-Stubbs S**, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A, Melero I. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2011;17:2619–27.
- [171] **Ivashkiv LB**, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 2014;14:36–49.
- [172] **Chawla-Sarkar M**, Lindner DJ, Liu Y-F, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis Int J Program Cell Death* 2003;8:237–49.

- [173] **Mohty M**, Vialle-Castellano A, Nunes JA, Isnardon D, Olive D, Gaugler B. IFN- α skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities. *J Immunol Baltim Md* 1950 2003;171:3385–93.
- [174] **Kiefer K**, Oropallo MA, Cancro MP, Marshak-Rothstein A. Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells. *Immunol Cell Biol* 2012;90:498–504.
- [175] **Davis LS**, Hutcheson J, Mohan C. The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res* 2011;31:781–9.
- [176] **Mackay F**, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 2009;9:491–502.
- [177] **Davidson A**. Targeting BAFF in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2010;22:732–9.
- [178] **Costa-Reis P**, Sullivan KE. Genetics and epigenetics of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15:369.
- [179] **Cui Y**, Sheng Y, Zhang X. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. *J Autoimmun* 2013;41:25–33.
- [180] **Deng Y**, Tsao BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:683–92.
- [181] **Wu YL**, Hauptmann G, Viguier M, Yu CY. Molecular basis of complete complement C4 deficiency in two North-African families with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2009;10:433–45.
- [182] **Guiducci C**, Ghirelli C, Marloie-Provost M-A, Matray T, Coffman RL, Liu Y-J, et al. PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid predendritic cells in response to TLR activation. *J Exp Med* 2008;205:315–22.
- [183] **Yang Y**, Chung EK, Wu YL, Savelli SL, Nagaraja HN, Zhou B, et al. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *Am J Hum Genet* 2007;80:1037–54.
- [184] **Mueller M**, Barros P, Witherden AS, Roberts AL, Zhang Z, Schaschl H, et al. Genomic pathology of SLE-associated copy-number variation at the FCGR2C/FCGR3B/FCGR2B locus. *Am J Hum Genet* 2013;92:28–40.
- [185] **Dong C**, Ptacek TS, Redden DT, Zhang K, Brown EE, Edberg JC, et al. Fc γ Receptor IIIa Single-Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes Affect Human IgG Binding and Are Associated With Lupus Nephritis in African Americans. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2014;66:1291–9.
- [186] **Jönsson A**, Gunnarsson I, Gullstrand B, Svenungsson E, Bengtsson AA, Nived O, et al. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and Fc γ RIIIa genes. *Rheumatol Oxf Engl* 2007;46:1417–21.
- [187] **Lee YH**, Ji JD, Song GG. Fc γ receptor IIB and IIIB polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Lupus* 2009;18:727–34.
- [188] **Laska MJ**, Trolborg A, Hansen B, Stengaard-Pedersen K, Junker P, Nexø BA, et al. Polymorphisms within Toll-like receptors are associated with systemic lupus erythematosus in a cohort of Danish females. *Rheumatol Oxf Engl* 2014;53:48–55.
- [189] **Lee YH**, Lee H-S, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between TLR polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30:262–5.
- [190] **Zhang J**, Zhu Q, Meng F, Lei H, Zhao Y. Association study of TLR-9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus in northern Chinese Han population. *Gene* 2014;533:385–8.
- [191] **Stone RC**, Feng D, Deng J, Singh S, Yang L, Fitzgerald-Bocarsly P, et al. Interferon regulatory factor 5 activation in monocytes of systemic lupus erythematosus patients is triggered by circulating autoantigens independent of type I interferons. *Arthritis Rheum* 2012;64:788–98.
- [192] **Cham CM**, Ko K, Niewold TB. Interferon regulatory factor 5 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:780436.
- [193] **Sigurdsson S**, Nordmark G, Garnier S, Grundberg E, Kwan T, Nilsson O, et al. A risk haplotype of STAT4 for systemic lupus erythematosus is over-expressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of IRF5. *Hum Mol Genet* 2008;17:2868–76.
- [194] **Sigurdsson S**, Nordmark G, Göring HHH, Lindroos K, Wiman A-C, Sturfelt G, et al. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2005;76:528–37.
- [195] **Ceribelli A**, Satoh M, Chan EKL. MicroRNAs and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2012;24:686–91.
- [196] **Namjou B**, Kothari PH, Kelly JA, Glenn SB, Ojwang JO, Adler A, et al. Evaluation of the TREX1 gene in a large multi-ancestral lupus cohort. *Genes Immun* 2011;12:270–9.
- [197] **Tan JA**, Roberts-Thomson PJ, Blumbergs P, Hakendorf P, Cox SR, Limaye V. Incidence and prevalence of idiopathic inflammatory myopathies in South Australia: a 30-year epidemiologic study of histology-proven cases. *Int J Rheum Dis* 2013;16:331–8.
- [198] **Bohan A**, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:344–7.
- [199] **Dalakas MC**, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 2003;362:971–82.
- [200] **Horai Y**, Koga T, Fujikawa K, Takatani A, Nishino A, Nakashima Y, et al. Serum interferon- α is a useful biomarker in patients with anti-melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) antibody-positive dermatomyositis. *Mod Rheumatol Jpn Rheum Assoc* 2014.
- [201] **Venalis P**, Lundberg IE. Immune mechanisms in polymyositis and dermatomyositis and potential targets for therapy. *Rheumatol Oxf Engl* 2014;53:397–405.
- [202] **Tournadre A**, Miossec P. A critical role for immature muscle precursors in myositis. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:438–42.
- [203] **Pestronk A**. Acquired immune and inflammatory myopathies: pathologic classification. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:595–604.
- [204] **Greenberg SA**, Pinkus JL, Pinkus GS, Burleson T, Sanoudou D, Tawil R, et al. Interferon- α /beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol* 2005;57:664–78.

- [205] **Hoogendijk JE**, Amato AA, Lecky BR, Choy EH, Lundberg IE, Rose MR, et al. 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2004;14:337-45.
- [206] **Mammen AL**. Autoimmune myopathies: autoantibodies, phenotypes and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 2011;7:343-54.
- [207] **Hall JC**, Casciola-Rosen L, Samedy L-A, Werner J, Owoyemi K, Danoff SK, et al. Anti-melanoma differentiation-associated protein 5-associated dermatomyositis: expanding the clinical spectrum. *Arthritis Care Res* 2013;65:1307-15.
- [208] **Hengstman GJD**, Vree Egberts WTM, Seelig HP, Lundberg IE, Moutsopoulos HM, Doria A, et al. Clinical characteristics of patients with myositis and autoantibodies to different fragments of the Mi-2 beta antigen. *Ann Rheum Dis* 2006;65:242-5.
- [209] **Trallero-Araguás E**, Rodrigo-Pendás JA, Selva-O'Callaghan A, Martínez-Gómez X, Bosch X, Labrador-Horrillo M, et al. Usefulness of anti-p155 autoantibody for diagnosing cancer-associated dermatomyositis: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2012;64:523-32.
- [210] **Mozaffar T**, Pestronk A. Myopathy with anti-Jo-1 antibodies: pathology in perimysium and neighbouring muscle fibres. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:472-8.
- [211] **Hervier B**, Devilliers H, Stanciu R, Meyer A, Uzunhan Y, Masseau A, et al. Hierarchical cluster and survival analyses of antisynthetase syndrome: phenotype and outcome are correlated with anti-tRNA synthetase antibody specificity. *Autoimmun Rev* 2012;12:210-7.
- [212] **Allenbach Y**, Benveniste O. Acquired necrotizing myopathies. *Curr Opin Neurol* 2013;26:554-60.
- [213] **Benveniste O**, Drouot L, Jouen F, Charuel J-L, Bloch-Queyrat C, Behin A, et al. Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 2011;63:1961-71.
- [214] **Mammen AL**, Chung T, Christopher-Stine L, Rosen P, Rosen A, Doering KR, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum* 2011;63:713-21.
- [215] **Larman HB**, Salajegheh M, Nazareno R, Lam T, Sauld J, Steen H, et al. Cytosolic 5'-nucleotidase 1A autoimmunity in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol* 2013;73:408-18.
- [216] **Pluk H**, van Hoeve BJA, van Dooren SHJ, Stammen-Vogelzangs J, van der Heijden A, Schelhaas HJ, et al. Autoantibodies to cytosolic 5'-nucleotidase 1A in inclusion body myositis. *Ann Neurol* 2013;73:397-407.
- [217] **Marguerie C**, Bunn CC, Beynon HL, Bernstein RM, Hughes JM, So AK, et al. Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Q J Med* 1990;77:1019-38.
- [218] **Love LA**, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Dalakas M, Plotz PH, et al. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* 1991;70:360-74.
- [219] **Chinoy H**, Adimulam S, Marriage F, New P, Vincze M, Zilahi E, et al. Interaction of HLA-DRB1*03 and smoking for the development of anti-Jo-1 antibodies in adult idiopathic inflammatory myopathies: a European-wide case study. *Ann Rheum Dis* 2012;71:961-5.
- [220] **Levine SM**, Raben N, Xie D, Askin FB, Tudor R, Mullins M, et al. Novel conformation of histidyl-transfer RNA synthetase in the lung: the target tissue in Jo-1 autoantibody-associated myositis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2729-39.
- [221] **Howard OMZ**, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, et al. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med* 2002;196:781-91.
- [222] **Soejima M**, Kang EH, Gu X, Katsumata Y, Clemens PR, Ascherman DP. Role of innate immunity in a murine model of histidyl-transfer RNA synthetase (Jo-1)-mediated myositis. *Arthritis Rheum* 2011;63:479-87.
- [223] **Fernandez I**, Harlow L, Zang Y, Liu-Bryan R, Ridgway WM, Clemens PR, et al. Functional redundancy of MyD88-dependent signaling pathways in a murine model of histidyl-transfer RNA synthetase-induced myositis. *J Immunol Baltim Md 1950* 2013;191:1865-72.
- [224] **Lundberg IE**, Helmers SB. The type I interferon system in idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 2010;43:239-43.
- [225] **Krystufková O**, Vallerskog T, Helmers SB, Mann H, Putová I, Beláček J, et al. Increased serum levels of B cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis* 2009;68:836-43.
- [226] **Chinoy H**, Salway F, Fertig N, Shephard N, Tait BD, Thomson W, et al. In adult onset myositis, the presence of interstitial lung disease and myositis specific/associated antibodies are governed by HLA class II haplotype, rather than by myositis subtype. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R13.
- [227] **Stone KB**, Oddis CV, Fertig N, Katsumata Y, Lucas M, Vogt M, et al. Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* 2007;56:3125-31.
- [228] **Houssiau FA**, Vasconcelos C, D'Cruz D, Sebastiani GD, de Ramon Garrido E, Danieli MG, et al. The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis* 2010;69:61-4.
- [229] **Ginzler EM**, Dooley MA, Aranow C, Kim MY, Buyon J, Merrill JT, et al. Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. *N Engl J Med* 2005;353:2219-28.
- [230] **Dooley MA**, Jayne D, Ginzler EM, Isenberg D, Olsen NJ, Wofsy D, et al. Mycophenolate versus azathioprine as maintenance therapy for lupus nephritis. *N Engl J Med* 2011;365:1886-95.
- [231] **Tsakonas E**, Joseph L, Esdaile JM, Choquette D, Sénécal JL, Cividino A, et al. A long-term study of hydroxychloroquine withdrawal on exacerbations in systemic lupus erythematosus. The Canadian Hydroxychloroquine Study Group. *Lupus* 1998;7:80-5.
- [232] **Kuznik A**, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J Immunol Baltim Md 1950* 2011;186:4794-804.
- [233] **Park B**, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim Y-M, Ploegh HL. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 2008;9:1407-14.

- [234] **Ding HJ**, Gordon C. New biologic therapy for systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13:405–12.
- [235] **Condon MB**, Ashby D, Pepper RJ, Cook HT, Levy JB, Griffith M, et al. Prospective observational single-centre cohort study to evaluate the effectiveness of treating lupus nephritis with rituximab and mycophenolate mofetil but no oral steroids. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1280–6.
- [236] **Oddis CV**, Reed AM, Aggarwal R, Rider LG, Ascherman DP, Levesque MC, et al. Rituximab in the treatment of refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis: A randomized, placebo-phase trial. *Arthritis Rheum* 2013;65:314–24.
- [237] **Rovin BH**, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum* 2012;64:1215–26.
- [238] **Navarra SV**, Guzmán RM, Gallacher AE, Hall S, Levy RA, Jimenez RE, et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2011;377:721–31.
- [239] **Dooley MA**, Houssiau F, Aranow C, D'Cruz DP, Askanase A, Roth DA, et al. Effect of belimumab treatment on renal outcomes: results from the phase 3 belimumab clinical trials in patients with SLE. *Lupus* 2013;22:63–72.
- [240] **Finck BK**, Linsley PS, Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science* 1994;265:1225–7.
- [241] **Mathian A**, Amoura Z, Adam E, Colaone F, Hoekman MFM, Dhellin O, et al. Active immunisation of human interferon α transgenic mice with a human interferon α Kinoid induces antibodies that neutralise interferon α in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1138–43.
- [242] **Lauwerys BR**, Ducreux J, Houssiau FA. Type I interferon blockade in systemic lupus erythematosus: where do we stand? *Rheumatol Oxf Engl* 2013.
- [243] **Higgs BW**, Zhu W, Morehouse C, White WI, Brohawn P, Guo X, et al. A phase 1b clinical trial evaluating sifalimumab, an anti-IFN- α monoclonal antibody, shows target neutralisation of a type I IFN signature in blood of dermatomyositis and polymyositis patients. *Ann Rheum Dis* 2014;73:256–62.
- [244] **Horton CG**, Pan Z, Farris AD. Targeting Toll-like receptors for treatment of SLE. *Mediators Inflamm* 2010;2010.
- [245] **Johansson S**, Berg L, Hall H, Höglund P. NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol* 2005;26:613–8.
- [246] **Shi FD**, Wang HB, Li H, Hong S, Taniguchi M, Link H, et al. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol* 2000;1:245–51.
- [247] **Zhang B**, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 1997;186:1677–87.
- [248] **Vollmer TL**, Liu R, Price M, Rhodes S, La Cava A, Shi F-D. Differential effects of IL-21 during initiation and progression of autoimmunity against neuroantigen. *J Immunol Baltim Md* 1950 2005;174:2696–701.
- [249] **Shi FD**, Takeda K, Akira S, Sarvetnick N, Ljunggren HG. IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN- γ by NK cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2000;165:3099–104.
- [250] **Lee I-F**, Qin H, Trudeau J, Dutz J, Tan R. Regulation of autoimmune diabetes by complete Freund's adjuvant is mediated by NK cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2004;172:937–42.
- [251] **Flodström M**, Maday A, Balakrishna D, Cleary MM, Yoshimura A, Sarvetnick N. Target cell defense prevents the development of diabetes after viral infection. *Nat Immunol* 2002;3:373–82.
- [252] **Poirot L**, Benoist C, Mathis D. Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8102–7.
- [253] **Takeda K**, Dennert G. The development of autoimmunity in C57BL/6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J Exp Med* 1993;177:155–64.
- [254] **Izumi Y**, Ida H, Huang M, Iwanaga N, Tanaka F, Aratake K, et al. Characterization of peripheral natural killer cells in primary Sjögren's syndrome: impaired NK cell activity and low NK cell number. *J Lab Clin Med* 2006;147:242–9.
- [255] **Schleinitz N**, Vély F, Harlé J-R, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2010;131:451–8.
- [256] **Ohata K**, Espinoza JL, Lu X, Kondo Y, Nakao S. Mycophenolic acid inhibits natural killer cell proliferation and cytotoxic function: a possible disadvantage of including mycophenolate mofetil in the graft-versus-host disease prophylaxis regimen. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2011;17:205–13.
- [257] **Chiossone L**, Vitale C, Cottalasso F, Moretti S, Azzarone B, Moretta L, et al. Molecular analysis of the methylprednisolone-mediated inhibition of NK-cell function: evidence for different susceptibility of IL-2- versus IL-15-activated NK cells. *Blood* 2007;109:3767–75.
- [258] **Gonzalez-Amaro R**, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. Natural killer cell activity in dermatomyositis-polymyositis. *J Rheumatol* 1987;14:307–10.
- [259] **Horikawa M**, Hasegawa M, Komura K, Hayakawa I, Yanaba K, Matsushita T, et al. Abnormal natural killer cell function in systemic sclerosis: altered cytokine production and defective killing activity. *J Invest Dermatol* 2005;125:731–7.
- [260] **Struyf NJ**, Snoeck HW, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Natural killer cell activity in Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus: stimulation with interferons and interleukin-2 and correlation with immune complexes. *Ann Rheum Dis* 1990;49:690–3.
- [261] **Sibbitt WL Jr**, Froelich CJ, Bankhurst AD. Abnormal interferon modulation of natural cytotoxicity in systemic lupus erythematosus. Relation to suppressive serum factors. *Arthritis Rheum* 1983;26:1452–9.
- [262] **Sibbitt WL Jr**, Gibbs DL, Kenny C, Bankhurst AD, Searles RP, Ley KD. Relationship between circulating interferon and anti-interferon antibodies and impaired natural killer cell activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1985;28:624–9.
- [263] **Yabuhara A**, Yang FC, Nakazawa T, Iwasaki Y, Mori T, Koike K, et al. A killing defect of natural killer cells as an underlying immunologic abnormality in childhood systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996;23:171–7.
- [264] **Wiendl H**, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Weiss EH, Dichgans J, et al. The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain J Neurol* 2003;126:176–85.

- [265] **Schleinitz N**, Cognet C, Guia S, Laugier-Anfossi F, Baratin M, Pouget J, et al. Expression of the CD85j (leukocyte Ig-like receptor 1, Ig-like transcript 2) receptor for class I major histocompatibility complex molecules in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 2008;58:3216–23.
- [266] **Dalbeth N**, Callan MFC. A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. *Arthritis Rheum* 2002;46:1763–72.
- [267] **Pridgeon C**, Lennon GP, Pazmany L, Thompson RN, Christmas SE, Moots RJ. Natural killer cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients exhibit a CD56bright,CD94bright,CD158negative phenotype. *Rheumatol Oxf Engl* 2003;42:870–8.
- [268] **De Matos CT**, Berg L, Michaëlsson J, Felländer-Tsai L, Kärre K, Söderström K. Activating and inhibitory receptors on synovial fluid natural killer cells of arthritis patients: role of CD94/NKG2A in control of cytokine secretion. *Immunology* 2007;122:291–301.
- [269] **Chan A**, Filer A, Parsonage G, Kollnberger S, Gundle R, Buckley CD, et al. Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondylarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells. *Arthritis Rheum* 2008;58:707–17.
- [270] **Söderström K**, Stein E, Colmenero P, Purath U, Müller-Ladner U, de Matos CT, et al. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:13028–33.
- [271] **Groh V**, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9452–7.
- [272] **Poggi A**, Zocchi MR. NK Cell Autoreactivity and Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2014;5:27.
- [273] **Fogel LA**, Yokoyama WM, French AR. Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res Ther* 2013;15:216.
- [274] **Momot T**, Koch S, Hunzelmann N, Krieg T, Ulbricht K, Schmidt RE, et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004;50:1561–5.
- [275] **Lowe DP**, Cook MA, Bowman SJ, Briggs DC, UK Sjögren's Interest Group. Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol Oxf Engl* 2009;48:359–62.
- [276] **Rusakiewicz S**, Nocturne G, Lazure T, Semeraro M, Flament C, Caillat-Zucman S, et al. NCR3/NKp30 contributes to pathogenesis in primary Sjögren's syndrome. *Sci Transl Med* 2013;5:195ra96.
- [277] **Dalbeth N**, Gundle R, Davies RJO, Lee YCG, McMichael AJ, Callan MFC. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol Baltim Md* 1950 2004;173:6418–26.
- [278] **Altfeld M**, Fadda L, Frleta D, Bhardwaj N. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat Rev Immunol* 2011;11:176–86.
- [279] **Cremer I**, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tumor microenvironment in NSCLC suppresses NK cells function. *Oncoimmunology* 2012;1:244–6.
- [280] **Marcenaro E**, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Sivori S. NK/DC crosstalk in anti-viral response. *Adv Exp Med Biol* 2012;946:295–308.
- [281] **Vitale M**, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol* 2014.
- [282] **Nguyen S**, Morel V, Le Garff-Tavernier M, Bolgert F, Leblond V, Debré P, et al. Persistence of CD16+/CD56-/2B4+ natural killer cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in ocular myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2006;179:117–25.
- [283] **Park Y-W**, Kee S-J, Cho Y-N, Lee E-H, Lee H-Y, Kim E-M, et al. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;60:1753–63.
- [284] **Huang Z**, Fu B, Zheng SG, Li X, Sun R, Tian Z, et al. Involvement of CD226+ NK cells in immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Immunol Baltim Md* 1950 2011;186:3421–31.
- [285] **Hagberg N**, Theorell J, Eloranta M-L, Pascal V, Bryceson YT, Rönnblom L. Anti-NKG2A autoantibodies in a patient with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Oxf Engl* 2013;52:1818–23.
- [286] **Lu L**, Ikizawa K, Hu D, Werneck MBF, Wucherpfennig KW, Cantor H. Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway. *Immunity* 2007;26:593–604.
- [287] **Antonoli CM**, Airò P. Dermatomyositis associated with lymphoproliferative disorder of NK cells and occult small cell lung carcinoma. *Clin Rheumatol* 2004;23:239–41.
- [288] **Culley FJ**. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology* 2009;128:151–63.
- [289] **Toyabe S**, Kaneko U, Uchiyama M. Decreased DAP12 expression in natural killer lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus is associated with increased transcript mutations. *J Autoimmun* 2004;23:371–8.
- [290] **Schleinitz N**, Chiche L, Guia S, Bouvier G, Vernier J, Morice A, et al. Pattern of DAP12 expression in leukocytes from both healthy and systemic lupus erythematosus patients. *PloS One* 2009;4:e6264.
- [291] **Kim S**, Sunwoo JB, Yang L, Choi T, Song Y-J, French AR, et al. HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3053–8.
- [292] **Hagberg N**, Berggren O, Leonard D, Weber G, Bryceson YT, Alm GV, et al. IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1 β and LFA-1. *J Immunol Baltim Md* 1950 2011;186:5085–94.
- [293] **Hagberg N**, Theorell J, Schlums H, Eloranta M-L, Bryceson YT, Rönnblom L. Systemic lupus erythematosus immune complexes increase the expression of SLAM family members CD319 (CRACC) and CD229 (LY-9) on plasmacytoid dendritic cells and CD319 on CD56(dim) NK cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2013;191:2989–98.
- [294] **Berggren O**, Hagberg N, Weber G, Alm GV, Rönnblom L, Eloranta M-L. B lymphocytes enhance interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2012;64:3409–19.
- [295] **Katchar K**, Söderström K, Wahlstrom J, Eklund A, Grunewald J. Characterisation of natural killer cells and CD56+ T-cells in sarcoidosis patients. *Eur Respir J* 2005;26:77–85.
- [296] **Papakosta D**, Kyriazis G, Gioulekas D, Kontakiotis T, Polyzoni T, Bouros D, et al. Variations in alveolar cell populations, lymphocyte subsets and NK-cells in different stages of active pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis Off J WASOG World Assoc Sarcoidosis Granulomatous Disord* 2005;22:21–6.

- [297] **Tucci M**, Quatraro C, Lombardi L, Pellegrino C, Dammacco F, Silvestris F. Glomerular accumulation of plasmacytoid dendritic cells in active lupus nephritis: role of interleukin-18. *Arthritis Rheum* 2008;58:251–62.
- [298] **Kanzler H**, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007;13:552–9.
- [299] **Horton CG**, Pan Z, Farris AD. Targeting Toll-like receptors for treatment of SLE. *Mediators Inflamm* 2010;2010.
- [300] **Lamphier M**, Zheng W, Latz E, Spyvee M, Hansen H, Rose J, et al. Novel small molecule inhibitors of TLR7 and TLR9: mechanism of action and efficacy in vivo. *Mol Pharmacol* 2014;85:429–40.
- [301] **Chauhan SK**, Singh VV, Rai R, Rai M, Rai G. Distinct autoantibody profiles in systemic lupus erythematosus patients are selectively associated with TLR7 and TLR9 upregulation. *J Clin Immunol* 2013;33:954–64.
- [302] **Thomas-Vaslin V**, Six A, Ganascia J-G, Bersini H. Dynamical and Mechanistic Reconstructive Approaches of T Lymphocyte Dynamics: Using Visual Modeling Languages to Bridge the Gap between Immunologists, Theoreticians, and Programmers. *Front Immunol* 2013;4:300.
- [303] **Woelke AL**, Murgueitio MS, Preissner R. Theoretical modeling techniques and their impact on tumor immunology. *Clin Dev Immunol* 2010;2010:271794.
- [304] **Eftimie R**, Bramson JL, Earn DJD. Interactions between the immune system and cancer: a brief review of non-spatial mathematical models. *Bull Math Biol* 2011;73:2–32.
- [305] **Mehr R**, Sternberg-Simon M, Michaeli M, Pickman Y. Models and methods for analysis of lymphocyte repertoire generation, development, selection and evolution. *Immunol Lett* 2012;148:11–22.
- [306] **Duffy D**, Rouilly V, Libri V, Hasan M, Beitz B, David M, et al. Functional analysis via standardized whole-blood stimulation systems defines the boundaries of a healthy immune response to complex stimuli. *Immunity* 2014;40:436–50.
- [307] **Petrovsky N**, Brusica V. Bioinformatics for study of autoimmunity. *Autoimmunity* 2006;39:635–43.

VII. Annexes

Annexe 1 : Critères ACR de classification du Lupus Systémique

Révisés in Arthritis & Rheumatism 1997

1. Rash malaire ;
2. Lupus discoïde ;
3. Photosensibilité ;
4. Ulcérations orales ou nasopharyngées ;
5. Arthrites non érosives touchant au moins 2 articulations périphériques, caractérisées par une douleur, un gonflement ou un épanchement ;
6. Pleurésie ou péricardite ;
7. Protéinurie persistante > 0,5 g/jour ou cylindrurie ;
8. Convulsions ou psychose (en l'absence de cause médicamenteuse ou métabolique) ;
9. Atteinte hématologique :
 - anémie hémolytique,
 - leucopénie < 4 000/μl constatée à 2 reprises,
 - lymphopénie < 1 500/μl constatée à 2 reprises, ou
 - thrombopénie < 100 000/μl, en l'absence de drogues cytopéniantes ;
10. Titre anormal de facteurs antinucléaires par immunofluorescence (en l'absence de drogues inductrices) ;
11. Perturbations immunologiques :
 - Titre anormal d'anticorps anti-ADN natif,
 - anticorps anti-Sm, ou
 - présence d'anticorps antiphospholipides : sérologie syphilitique dissociée constatée à 2 reprises en 6 mois ou anticoagulant circulant de type lupique ou titre anormal d'anticorps anti-cardiolipine en IgG ou IgM.

Quatre critères simultanés ou successifs sont nécessaires pour classer la maladie comme un lupus systémique

Annexe 2 : Critères de classification révisés: Systemic Lupus International Collaborating Clinics.

Pétri M et coll., Arthritis & Rheum 2012

Table 3. Clinical and immunologic criteria used in the SLICC classification system*

Clinical criteria	
1. Acute cutaneous lupus, including:	
Lupus malar rash (do not count if malar discoid)	
Bullous lupus	
Toxic epidermal necrolysis variant of SLE	
Maculopapular lupus rash	
Photosensitive lupus rash	
<i>in the absence of dermatomyositis</i>	
OR subacute cutaneous lupus (nonindurated psoriaform and/or annular polycyclic lesions that resolve without scarring, although occasionally with postinflammatory dyspigmentation or telangiectasias)	
2. Chronic cutaneous lupus, including:	
Classic discoid rash	
Localized (above the neck)	
Generalized (above and below the neck)	
Hypertrophic (verrucous) lupus	
Lupus panniculitis (profundus)	
Mucosal lupus	
Lupus erythematosus tumidus	
Chillblains lupus	
Discoid lupus/lichen planus overlap	
3. Oral ulcers	
Palate	
Buccal	
Tongue	
OR nasal ulcers	
<i>in the absence of other causes, such as vasculitis, Behçet's disease, infection (herpesvirus), inflammatory bowel disease, reactive arthritis, and acidic foods</i>	
4. Nonscarring alopecia (diffuse thinning or hair fragility with visible broken hairs)	
<i>in the absence of other causes such as alopecia areata, drugs, iron deficiency, and androgenic alopecia</i>	
5. Synovitis involving 2 or more joints, characterized by swelling or effusion	
OR tenderness in 2 or more joints and at least 30 minutes of morning stiffness	
6. Serositis	
Typical pleurisy for more than 1 day	
OR pleural effusions	
OR pleural rub	
Typical pericardial pain (pain with recumbency improved by sitting forward) for more than 1 day	
OR pericardial effusion	
OR pericardial rub	
OR pericarditis by electrocardiography	
<i>in the absence of other causes, such as infection, uremia, and Dressler's pericarditis</i>	
7. Renal	
Urine protein-to-creatinine ratio (or 24-hour urine protein) representing 500 mg protein/24 hours	
OR red blood cell casts	
8. Neurologic	
Seizures	
Psychosis	
Mononeuritis multiplex	
<i>in the absence of other known causes such as primary vasculitis</i>	
Myelitis	
Peripheral or cranial neuropathy	
<i>in the absence of other known causes such as primary vasculitis, infection, and diabetes mellitus</i>	
Acute confusional state	
<i>in the absence of other causes, including toxic/metabolic, uremia, drugs</i>	
9. Hemolytic anemia	
10. Leukopenia (<4,000/mm ³ at least once)	
<i>in the absence of other known causes such as Felty's syndrome, drugs, and portal hypertension</i>	
OR	
Lymphopenia (<1,000/mm ³ at least once)	
<i>in the absence of other known causes such as corticosteroids, drugs, and infection</i>	
11. Thrombocytopenia (<100,000/mm ³) at least once	
<i>in the absence of other known causes such as drugs, portal hypertension, and thrombotic thrombocytopenic purpura</i>	
Immunologic criteria	
1. ANA level above laboratory reference range	
2. Anti-dsDNA antibody level above laboratory reference range (or >2-fold the reference range if tested by ELISA)	
3. Anti-Sm: presence of antibody to Sm nuclear antigen	
4. Antiphospholipid antibody positivity as determined by any of the following:	
Positive test result for lupus anticoagulant	
False-positive test result for rapid plasma reagin	
Medium- or high-titer anticardiolipin antibody level (IgA, IgG, or IgM)	
Positive test result for anti-β ₂ -glycoprotein I (IgA, IgG, or IgM)	
5. Low complement	
Low C3	
Low C4	
Low CH50	
6. Direct Coombs' test <i>in the absence of hemolytic anemia</i>	

* Criteria are cumulative and need not be present concurrently. SLICC = Systemic Lupus International Collaborating Clinics; SLE = systemic lupus erythematosus; ANA = antinuclear antibody; anti-dsDNA = anti-double-stranded DNA; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay.

Annexe 3 : Score d'activité du Lupus Systémique (SLEDAI-2K)

♦ Formulaire d'évaluation du Lupus Erythémateux Systémiques (SLEDAI) 4 weeks

(Cochez la case si les signes décrits sont présents au moment de l'évaluation
ou dans les 4 semaines précédentes)

Symptôme / signe	Définition	Dans les 4 semaines précédentes	
Convulsion	Début récent. Absence de cause métabolique, infectieuse ou médicamenteuse.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Psychose	Perturbation des activités quotidiennes normales, liée à un trouble sévère de la perception de la réalité, dont hallucinations, incohérence, perte des associations d'idées, appauvrissement du contenu de la pensée, pensées illogiques, comportement bizarre, désorganisé ou catatonie. Absence d'insuffisance rénale aiguë ou de cause médicamenteuse.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Syndrome cérébral organique	Altération fluctuante des fonctions cognitives d'apparition rapide, avec désorientation, troubles de la mémoire ou des autres fonctions supérieures, dont obscurcissement des idées avec difficultés de concentration et incapacité de prêter attention à son environnement, et au moins deux des signes suivants: trouble de la perception, discours incohérent, insomnie ou somnolence diurne, ou augmentation ou diminution de l'activité psychomotrice. Absence de cause métabolique, infectieuse ou médicamenteuse.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Trouble visuel	Anomalies rétinienues liées au lupus, dont corps cytoïdes, hémorragies rétinienues, exsudat séreux ou hémorragies choroïdienues, névrite optique, sclérite ou épisclérite. Absence d'hypertension, de cause infectieuse ou médicamenteuse.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Atteinte des nerfs crâniens	Apparition récente d'une neuropathie sensitive ou motrice des nerfs crâniens. Ceci inclut des vertiges dus au lupus.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Céphalées lupiques	Céphalées intenses, persistantes, parfois migraineuses, mais résistantes aux morphiniques.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
AVC	AVC récent(s). Absence d'athérosclérose.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Vascularite	Ulcération, gangrène, nodules digitaux douloureux, infarctus péri-unguéal, hémorragie sous unguéale ou vascularite prouvée par biopsie ou angiographie.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Arthrites	Plus de deux articulations douloureuses et inflammatoires (palpation douloureuse, gonflement, épanchement...).	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Myosite	Douleur/faiblesse musculaire proximale, associée à une élévation des CPK ou de l'aldolase ou à des modifications de l'électromyogramme, ou à une preuve histologique de myosite.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Rash cutané	Rash inflammatoire.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Alopécie	Perte de cheveux anormale, diffuse ou en plaque.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Ulcération des muqueuses	Ulcérations orales ou nasales.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Pleurésie	Douleur thoracique de type pleurale avec frottement, épanchement, ou épaississement pleural liée au lupus.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Péricardite	Douleur péricardique avec au moins un des signes suivants: frottement, épanchement, ou confirmation à l'ECG ou à l'échographie.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
Fièvre	> 38°C. Absence de cause infectieuse.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
*Baisse du complément	Diminution du CH50, C3, ou C4 en dessous de la valeur normale inférieure.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
*Cylindres urinaires	Cylindres granuleux ou hématuriques	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
*Hématurie	> 5 hématies/champs (grossissement max) ou 25/mm ³ . Absence de lithiase, d'infection ou d'autres causes...	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
*Protéinurie	> 0.5 g/24h	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
*Leucocyturie	> 5 leucocytes/champs (grossissement max) ou 25/mm ³ . Absence d'infection.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
*Augmentation des anticorps anti-ADN	Test de Farr positif (selon la norme du laboratoire) ou présence d'anticorps anti-ADN supérieur au seuil du test ELISA utilisé.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
*Thrombocytopénie	< 100 000 plaquettes/mm ³ .	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non
*Leucopénie	< 3 000 leucocytes/mm ³ . Absence de cause médicamenteuse.	<input type="checkbox"/> _(r) Oui	<input type="checkbox"/> _(o) Non

Annexe 4 : Syndrome des Antisynthétases : revue de la Littérature.

Curr Rheumatol Rep (2013) 15:349
DOI 10.1007/s11926-013-0349-8

INFLAMMATORY MUSCLE DISEASE (I LUNDBERG, SECTION EDITOR)

Clinical Heterogeneity and Outcomes of Antisynthetase Syndrome

Baptiste Hervier · Olivier Benveniste

Published online: 23 June 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract The autoimmune connective tissue disease anti-synthetase syndrome (ASS) is an inflammatory myopathy associated with myositis-specific autoantibodies, e.g. anti-tRNA-synthetase antibodies (ASA). Since 1976 eight different ASA have been rigorously identified, of which anti-histidyl-tRNA synthetase (anti-Jo1) is the most prevalent. Other phenotype features of ASS include interstitial lung disease (ILD), Raynaud's phenomenon, polyarthritis, fever, and mechanic's hands. The clinical presentation of ASS varies greatly, as does the severity of involvement of different organs—both among patients and/or over the course of the disease. ILD has been associated with poor outcomes, but in general the heterogeneity of ASS prevents identification of robust prognosis indicators. Early identification of patients requiring aggressive immunosuppressive treatment is very challenging, and there are very few prospective trials available to help match treatment management to ASS clinical characteristics. This review will focus on the biological, clinical, functional, and morphological features of ASS associated with patient outcome. Our objective is to use compiled data on these subjects to discuss the usefulness of patient stratification in developing future prospective therapeutic trials.

Keywords Inflammatory myopathy · Myositis · Myositis-specific antibodies · Antisynthetase · Anti-Jo1 · Interstitial lung disease · Clinical heterogeneity

Abbreviations

ASS Anti-synthetase syndrome
ASA Anti-synthetase antibody
ILD Interstitial lung disease
SSc Systemic sclerosis
SS Sjögren syndrome

Introduction

Antisynthetase syndrome (ASS), a heterogeneous autoimmune connective tissue disease, was first described in the 1980s as a singular inflammatory myopathy associated with particular myositis-specific autoantibodies [1, 2]. These autoantibodies are specifically directed against the aminoacyl-tRNA-synthetase enzymes. Anti-Jo1 (anti-histidyl-tRNA synthetase antibody) was the first of several anti-aminoacyl-tRNA-synthetase antibodies (ASA) described in ASS, and is also the most prevalent. It has been suggested, mainly because anti-Jo1 may correlate with disease activity, that these antibodies could be involved in the pathogenesis of the disease [3].

ASS mostly affects adults, at any age, and is more common for women (the female-to-male ratio is 2; Table 1). The clinical presentation of ASS varies greatly, and although some classification criteria have been proposed, they have yet to be validated [4]. In most cases, ASS includes at least inflammatory myositis and/or interstitial lung disease (ILD) [5••]. Other non-specific features are quite commonly reported, including polyarthritis, mechanic's hands, and Raynaud's phenomenon [1, 2]. Involvement of other organs is less frequently described, but includes heart (pericarditis, myocarditis)

This article is part of the Topical Collection on *Inflammatory Muscle Disease*

B. Hervier (✉)
Internal Medicine Department, French Referral Center for Lupus and Antiphospholipid Syndrome, APHP, Hôpital Pitié Salpêtrière, 47-83 Boulevard de L'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, Paris, France
e-mail: baptiste.hervier@psl.aphp.fr

O. Benveniste
Internal Medicine Department, French Referral Center for Muscular Diseases, APHP, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France

Table 1 Age, sex ratio and prevalence of the clinical signs of antisynthetase syndrome among the major recent studies

Ref.	[43] ^a	[58]	[53]	[59]	[37]	[57]	[61]	[5••] ^e	[9••]	[5••] ^e	[29]	[94]	[5••] ^e	[11•]	[31]	[30]
Number of patients	231	20	32	90	27	37	89	160	31	48	6	6	25	18	7	6
ASA subtype	Various	Various	Jo1	Jo1	Jo1	Jo1	Jo1	Jo1	PL12	PL12	PL7	PL7	PL7	PL7	O1	EJ
Mean or median age at diagnosis	–	–	32–73 ^f	43	40	57 ^c	18–79 ^f	47	51	52	53	52	51	53	53	43
Women/men ratio	–	–	1.9	–	12.5	2.1	1.8	2.6	4.2	2.2	1.3	6	2.1	5	1.3	2
Fever	–	43	44	32	37	41	–	24	45	38	57	–	40	56	43	–
RP	50	67	25	41	96	27	47	43	65	48	57	33	32	61	0	67
Myositis	91	100 ^b	34 ^d	93	100	68	100	74	52	40	86	67	44	94	57	100
Arthralgia/arthritis	74	57	72/16	72	96/–	65	65	71/24	58	46/13	86	50/–	44/12	67	57	83
ILD	75	95	100 ^b	–	100 ^b	70	74	67	90	88	100	100	80	56	100	83
MH	21	33	28	–	11	19	42	23	16	8	33	–	20	28	–	–
DM rash	22	–	16	–	15	–	–	29	–	25	14	–	24	–	0	83
Dry mouth/eye	34	–	10	–	–	–	–	33	–	42	–	–	36	–	0	–
Sclerodactyly or other SSc signs	26	–	–	–	–	–	–	24	–	38	71	–	32	–	0	–

ASA, anti-tRNA synthetase antibodies; RP, Raynaud's phenomenon; DM, dermatomyositis; SSC, systemic sclerosis

^a Review of the literature^b Inclusion criteria^c Of the whole cohort, which included non-Jo 1 ASA^d Myalgia^e Prevalence at diagnosis of ASS^f Minimum–maximum patient's age

or digestive (gastro-oesophageal reflux, dysphagia) involvement. Associated symptoms overlapping with Sjögren syndrome (SS) or systemic sclerosis (SSc) have also been reported to varying extents. The prevalence of these chronic manifestations varies between patients (Table 1), and their onsets for a given patient sometimes occur over several years. The overall prognosis for ASS seems to be worse than that for other myositides, largely because of the higher prevalence of lung involvement [2, 6–8].

There has been some progress over the past few years in understanding the immune mechanisms of the disease. However, our review will focus on its clinical characteristics, in particular the heterogeneity of its manifestations, and attempt to describe clinical outcomes for each organ involvement. Most early studies selected patients exclusively on the basis of myositis associated with ILD, which led to the inclusion of both ASA-positive and ASA-negative patients. This made it challenging to accurately and specifically describe the characteristics of the ASS patients. Additionally, because testing for non-Jo1 ASA has only recently become common, patients from these studies who had ASS may have been wrongly believed to be ASA-negative. Therefore this review will focus on the most recently published studies, especially those of ASA-positive patients and those comparing clinical phenotype features of ASS in relation to their ASA specificity [5•, 9•, 10, 11•]. We will also focus on the outcomes of ASS and the need to identify patients with a poor prognosis, who require aggressive immunosuppressive therapy. We will also draw on recent data to discuss possible future clinical investigations and therapy developments for ASS.

Biological Variables

Over recent years, description of animal models [12] and immunology studies of humans have resulted in progress in understanding the pathogenesis of ASS. These studies have revealed the effect of both innate and adaptive immune cells [13–15]. However, this review will focus on recent advances related to the clinical presentation of ASS. These include better characterisation of patients with non-Jo-1 ASA or other autoantibodies [5•, 10], better understanding of ASS immune susceptibility [16], and description of a variety of serology biomarkers.

Serology Biomarkers

Immune Biomarkers

Of the immune molecules studied in relation to ASS, interferon (IFN)- α and B-cell activating factor (BAFF or BLys) are probably the most promising biomarkers [17, 18] and

can be easily measured in patient serum. Although involved with different immune pathways, IFN- α and BAFF are both associated with numerous autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus, Sjögren syndrome, and myositides. IFN- α is a cytokine and is mainly produced by plasmacytoid dendritic cells, which have an important function in myositides in general [19] and ASS in particular. It has been found that ASA can act as IFN- α inducers, leading to muscle changes [17]; this IFN- α -inducing capacity of ASA has also been associated with lung involvement [17]. Similarly to IFN- α , BAFF is increased in patients with ASS [18]. BAFF levels also seem to correlate with both ILD and the severity of muscle involvement (serum creatine kinase). Steroid treatments are associated with low levels of BAFF, suggesting a link between BAFF and ASS activity [18].

Although it has not become commonplace to use IFN- α and BAFF dosage in management of patients with ASS, their implication in ASS is of importance. Specific therapy directed against each biomarker is in development.

Biomarkers Associated with Lung Involvement

Recent studies have suggested that some serology biomarkers, in particular serum KL-6, may correlate with lung involvement in various myositides [20–22]. However, none of these studies has focused on ASS, making it difficult to relate their results to this disease. Dedicated future studies are needed to determine the value of these biomarkers for clinical practice.

Antisynthetase Antibodies

Description

ASA are directed against ubiquitous cytoplasm enzymes specialised for the attachment of a specific amino acid to its cognate tRNA molecule. Because 20 essential α -amino acids are present in humans, 20 ASA could theoretically be described. However, since 1976 and the first description of an ASA (called anti-Jo1 after being found in a patient named John) [23], only eight ASA have been identified. Anti-Jo1 is the most common of these (2/3 of the ASA) and is found in approximately 20–25 % of patients with myositides [24–26]. It has recently become standard procedure in Europe to use commercial line immuno-blot assays (Euro-immun, Lübeck, Germany), including anti-alanyl (PL12), anti-threonyl (PL7), anti-isoleucyl (OJ), and anti-glycyl(EJ)-tRNA-synthetase antibodies, to test for five other ASA [27, 28]. Although their prevalence may be underestimated, these non-Jo1 ASA are rarely found: ignoring possible variation between ethnic groups, they constitute <1/5 of the entire set of ASA and are found in <5 % of patients with myositides

Table 2 The different anti-tRNA synthetase antibodies and their prevalence in inflammatory myopathies (IM)

Anti-tRNA-synthetase antibody subtype	Target antigen (tRNA-synthetase)	Prevalence in IM patients
Jo-1	Histidyl	20–25 %
PL12	Alanyl	5 %
PL7	Thronyl	5 %
OJ	Isoleucyl	<5 %
EJ	Glycyl	<5 %
KS	Asparaginyll	<1 %
Zo	Phenylalanyl	<<1 %
YRS/Tyr	Tyrosyl	<<1 %

(Table 2) [24–26]. The ASA could be associated with other anti-extractable nuclear antigen antibodies, including anti-Ro/SSA or anti-La/SSB, but the general consensus is that they are mutually exclusive.

ASA, Immunogenetics and Clinical Features

It was recently revealed that the clinical heterogeneity of ASS may be explained, at least in part, by the specificity of ASA (reviewed in Ref. [7]). For example, anti-PL7 and anti-PL12 are more strongly associated with ILD and indicate a disease more restricted to the lung, with the absence of muscle involvement [5•, 9•, 10]. ILD related to these non-Jo1 ASA can also be more severe at diagnosis, as determined by pulmonary function tests and HRCT findings, than ILD related to anti-Jo1 [5•], which seems to be associated with a more complex and extended clinical phenotype [5•, 10]. Moreover, myositis may be more common, more severe, and more resistant to treatment for patients with anti-Jo1 than for those with anti-PL12 and anti-PL7 [5•, 29]. Because patients with other ASA are rare (Table 2), the clinical features of these ASS subtypes are based on a few small studies, and as a result are difficult to characterise [30, 31]. Additional and larger descriptive studies of patients with anti-EJ, anti-OJ, etc. would be of interest.

The associations between human leucocyte antigen-(HLA) type II haplotypes and autoantibody specificity seen in other inflammatory myopathies have recently been found in ASS. As a result, attention has been drawn to links between HLA DR, DQ or DP and anti-Jo1 or anti-PL-12 (reviewed in Ref. [32]). It has been suggested that other clinical characteristics of ASS (i.e. other than this ASA subtype) could be closely related to these HLA alleles [33•].

ASA and Prognosis

ASA specificity cannot on its own account for the entire ASS phenotype or for the severity of ASS. Our recent work has

revealed, by use of hierarchical cluster analysis, that patients with anti-Jo1 and anti-PL12/7 can be distinguished on the basis of differences in the prevalence at diagnosis of ILD, myositis, or Raynaud's phenomenon [5•]. Although no correlation was found between being in a particular cluster and patient survival, this retrospective study did determine, by use of bivariate analysis, that survival was worse for patients with anti-PL12/7 ASA than for those with anti-Jo1 [5•]. However, this difference was not confirmed by multivariate analysis, suggesting that ASA subtype was not an independent prognostic factor. Mortality for ASS in general, and patients with anti PL7/12 in particular, was clearly related to acute or chronic ILD complications. The prognosis for ASS may therefore be related to ASS clinical characteristics, including the initial severity of ILD, rather than to ASA specificity itself.

Association of ASA with Other Autoantibodies

Anti-SSA/Ro Antibodies

The two types of anti-SSA/Ro (anti-SSA/Ro 60 and 52 kDa) are commonly found in SS [34], and may also be associated with other autoimmune disorders, including systemic lupus erythematosus. They have also been widely reported in patients with ASS [9•, 35, 36]. Irrespective of the clinical symptoms of SS, co-occurrence of anti-SSA/Ro may have an effect on ASS prognosis: it has been suggested that ILD was more severe (in terms of HRCT scores, pulmonary function tests, and/or immunosuppressive treatment response) in cases of ASS associated with anti-Jo1 and anti-SSA/Ro positivity [36–38]. However, this was not confirmed by two recent studies focused on patients with different ASA [5•] and on anti-Jo1 patients [39•], and considering anti-SSA/Ro-52 kDa positivity only. In the latter study, the authors did suggest that the presence of anti-SSA/Ro-52 kDa was detrimental to ASS prognosis, because of more severe muscle and joint symptoms and increased cancer occurrence. These discrepancies may be related to the retrospective nature of existing studies, and further studies are therefore required to better characterise the phenotype of ASS associated with both anti-SSA 60 and 52 kDa and to improve treatment for these patients.

Other Autoantibodies

In rare cases, different autoantibodies usually associated with other autoimmune diseases are detected in ASS patients. Positive test results for additional auto-antibodies, including anti-RNP, anti-Sm, or anti-DNA (observed in mixed connective tissue disease or systemic lupus erythematosus, respectively), may be associated with a higher prevalence of Raynaud's phenomenon and signs of dermatomyositis [5•].

Anti-cyclic-citrullinated-peptide antibodies, usually associated with rheumatoid arthritis, have also been detected in patients with ASS and may correlate with deforming arthropathy [40–42]. However, the prognostic significance of these immunological associations has yet to be determined [1, 5•, 43].

Clinical Manifestations, Treatment, and Outcome

Since ASS was first described, substantial heterogeneity, both in phenotype and in severity of disease, has been observed. As a result, positive diagnosis of ASS remains difficult, especially for cases of “amyopathic ASS”. Treatment outcome is also difficult to predict, and careful monitoring of each patient should be regularly performed to detect any possible extension or complication of the disease and enable adjustment of immunosuppressive treatments.

Muscle Involvement

Variability of the Muscle Phenotype

It became possible to assess the prevalence of myositis in ASS when studies began to include ASS patients on the basis of ASA positivity, rather than the existence of myositis itself. In the first clinical description of ASS and in later studies, prevalence of myositis ranged from 73 to 94 % [1, 5•, 11•]. This manifestation and its severity are heterogeneous among patients with ASS. When present, muscle involvement takes on different aspects, varying from asymptomatic increased creatine kinase levels or isolated myalgia to severe muscle weakness which sometimes leaves patients bedridden. These differences may also be observed in the same patient at different times over the course of the disease.

For less severely affected or asymptomatic patients, electromyography and muscular magnetic resonance imaging may be helpful for detecting muscle involvement. However, as far as we are aware, no study has investigated the potential of such techniques for diagnosing asymptomatic myositis or for evaluating the long-term prognosis.

Muscle Histology

Although muscle biopsy is regularly performed for ASS patients, very few studies have specifically investigated the muscular pathology of ASS with the objective of describing specific features. Pathology features meet the defined international criteria for dermatomyositis (including perifascicular atrophy) more frequently than polymyositis (including invaded myofibres) or necrotising myopathy [44•]. A specific pattern—perimysial connective tissue fragmentation and inflammation—was found to correlate with anti-Jo1 muscle

involvement in a small histology study of 11 patients [45]. As far as we are aware, there is no work to date that specifically correlates histology features with baseline severity or long-term prognosis of muscle involvement in ASS.

Development of Muscle Weakness Under Treatment

There have been no randomised trials comparing the efficacy of different immunosuppressive drugs on muscle recovery in ASS, nor evaluating their effects relative to placebo. When targeted against myositis, first-line treatment choice is empirically similar for ASS and other inflammatory myopathies. Intravenous and/or oral steroids, either alone or combined with immunosuppressive drugs, for example methotrexate or azathioprine, are usually prescribed [46]. Intravenous immunoglobulins are usually reserved for the most severe muscle involvement. In more than two-thirds of cases, muscle weakness improves under these immunosuppressive treatments [10, 36, 47]. However, patients may develop chronic myositis with substantial deterioration or recurrence [10, 47, 48]. Such long-term evolution is difficult to predict, and means that the number of types of treatment necessary to achieve prolonged muscular remission may be substantial for some patients [36, 48]. A recent prospective study suggested that anti-CD20 monoclonal antibody was a promising therapy for unresponsive cases [49••]. However, this trial was not limited to the study of ASS. The value of anti-CD20 should therefore be confirmed, and compared with that of other therapeutic options, by means of a dedicated prospective trial. As well as medication, appropriate exercise therapy is essential to limit long-term muscular damage [50, 51].

Long-Term Prognosis

It was recently shown that the existence of muscle weakness at diagnosis of ASS was associated with better survival, providing an indirect confirmation of the severity of amyopathic ASS [5••]. It is possible that patients with severe myositis at diagnosis may be diagnosed sooner and/or treated more aggressively than asymptomatic patients, with early treatment resulting in a better overall response. Nonetheless, even if muscle involvement has no positive correlation with death, it still causes major physical handicap and is likely to substantially impair the patient's quality of life. This should be taken into consideration when managing treatment of patients with ASS.

Interstitial Lung Disease

ILD Patterns and Prevalence

ILD encompasses several distinct lung diseases characterised by deleterious inflammation of the lung parenchyma, leading

in most cases to fibrosis. ILD can be isolated (idiopathic pulmonary fibrosis for example) or associated with different granulomatoses (for example sarcoidosis) or connective tissue diseases (including inflammatory myopathies and ASS in particular). Although amyopathic ASS have been described [52, 53], ILD is rarely isolated and the prevalence of ASA in apparently “idiopathic ILD” is quite low [54, 55]. For patients with myositides, ILD has long been strongly correlated with ASA positivity and with anti-Jo1 in particular [7, 56–58]. In the most recent reports, in which ILD screening was more easily performed, ILD was the most frequent ASS manifestation, seen in >72 % of patients [5••, 9••, 10, 59]. The frequency with which ILD is diagnosed in ASS patients depends on how the ILD is defined and at what point during the course of ASS an evaluation for ILD takes place: ILD may be diagnosed at any time, even after years of ASS stability.

ASS-ILD covers a broad range, with much clinical, morphological, and histological heterogeneity among patients. ILD onset often differs from one case to another. Most patients with ILD present with more or less severe and progressive dyspnea, possibly associated with a persistent cough. However, some patients may be asymptomatic (diagnosis of ILD being made by chance after a systematic HRCT-scan or pulmonary function tests) whereas other patients may present with an acute respiratory distress syndrome.

Initial Severity and Prognosis

Although heterogeneous, ILD is often the dominant symptom in ASS and is the greatest contributor to ASS morbidity and mortality [6, 7, 57]. Upon diagnosis of ILD, the objective is therefore to evaluate its initial severity and to identify predictive factors for its long-term treatment outcome. Similar to descriptions of ILD associated with non-ASS myositides, three ILD outcomes have been reported for ASS patients under treatment: resolution, stability, and deterioration (1/5, 3/5, and 1/5 of cases, respectively). The respective percentages of these outcomes depend on which criteria are used and on the time of evaluation [10, 60]. Because of the heterogeneity of ASS-ILD and the different immunosuppressive options, conflicting data have emerged from different retrospective studies. This has led to difficulties in clearly analysing the factors predictive of ILD evolution under treatment, indicating the need for careful analysis of each clinical, functional, and morphological lung variable.

Onset of ILD Two types of ASS-associated ILD onset have been described: acute and gradual. These types probably correspond to different pulmonary diseases and determine different ILD prognoses. Patients with acute onset frequently

present with severe dyspnea, associated with fever and usually corresponding to diffuse alveolar damage. These particular forms usually require intensive care and are associated with the worst long-term prognosis [53, 59]. Such patients usually present with an amyopathic ASS and—though there may be an initial improvement phase—develop a progressive ILD [53].

On the basis of the most recent retrospective studies, severity of dyspnea (NYHA III and IV) at diagnosis of ASS has also been correlated with survival [5••].

As well as onset type, it has been suggested that respiratory muscle involvement and aspiration pneumonia greatly worsen ILD prognosis [61].

Long-term ILD prognosis remains to some extent unpredictable. In a similar manner to that reported for various myositis-related ILD, some severely ill patients may improve or recover [53]. Conversely, patients with a milder and more progressive onset may suddenly deteriorate, even after a long follow-up period of stability. Functional and morphological variables should therefore be regularly and repeatedly assessed over time to predict individual ILD prognosis. Pulmonary function tests and HRCT-scans seem useful in achieving this.

Baseline Pulmonary Function Tests The most informative and predictive variable in pulmonary function tests seems to be the reduction in diffusing lung carbon monoxide capacity [36, 61], rather than the baseline vital capacity. The six-minute walk-test has been shown to be a useful functional variable for following patients with other lung diseases. However, because muscle weakness impairs the patient's ability to walk, use of the six-minute walk-test as a reproducible pulmonary variable is questionable in the context of ASS.

Radiology Findings For cases of ILD, detailed analyses of the HRCT scan provide two types of information: the extent of the ILD and its radiological pattern.

Important radiology studies of patients with SSC have revealed that the extent of ILD correlates with its severity [62]. However, very little is known regarding how the extent of ILD affects ASS survival. As far as we are aware, very few studies (reviewed in Ref. [60]) have focused on ILD extent and fibrosis scores based on HRCT scans [62, 63]. Although these studies succeeded in correlating these variables with long-term treatment outcome, they usually failed to correlate them with survival [36–38].

According to the International Consensus Statement [64], three main radiological patterns are described for progressive ILD: more or less cellular or fibrosing non-specific interstitial pneumonia, usual interstitial pneumonia, and organising pneumonia. None of these are specific to ASS and, as for

other connective tissue diseases including SSc, non-specific interstitial pneumonia is most prevalent, ranging from 59 to 77 % [5•, 10]. ASS studies comparing the prognostic value of radiological ILD patterns have reported different results. However, in most studies there is a tendency for usual interstitial pneumonia (corresponding to a honeycomb pattern) to be associated with the worst prognosis [61]. The implications of the two other patterns for disease progression or survival are less clear [5•].

Histology Features Aside from a bronchoalveolar lavage, histological characterisation of ILD is rarely performed. Bronchoalveolar lavage is usually performed to exclude alternative diagnoses, for example infections, but in some studies the proportion of neutrophils in bronchoalveolar lavage may be associated with a poorer prognosis [53].

Open-lung or transbronchial lung biopsies are limited to specific circumstances. In cases of acute and severe ILD, clinicians usually deferred this procedure because of its high morbidity and the good correlation between radiology and histology patterns. In the few dedicated studies, the percentages of the different histological ILD subtypes vary from one study to another, depending on whether they are on the basis of lung biopsy or necropsy. These differences in the prevalence of histology vs. radiology patterns probably reflect the tendency to only perform lung biopsy only in selected cases, including deteriorating patients. However, the worse prognosis for usual interstitial pneumonia, compared with non-specific interstitial pneumonia, was confirmed [61]. Lung biopsies were not systematically and consecutively performed in these studies, probably biasing the results to some extent [65].

Evaluating the Progression of the Disease

Although the initial ILD evaluation provides some information about the prognosis of the disease, especially for the most severe ILD, early and reproducible variables are needed to better predict the possible deterioration of progressive ILD over the course of ASS. As it has been suggested for patients with ILD associated with different myositis [66], longitudinal studies evaluating disease progression over the first months of follow-up could provide instructive data on long-term ILD prognosis. Such prospective descriptive studies, coupling and repeating clinical, functional, and radiological analysis to obtain early information regarding the severity of the ILD, would be of interest. Such predictions could lead to adaptive immunosuppressive therapy. Echocardiography should be regularly performed for patients with ILD progression; pulmonary hypertension can develop in some ASS patients with ILD, and greatly worsen the prognosis [67•].

Treatment and Prognosis

Because it is the main cause of morbidity and mortality in inflammatory myopathies and in ASS in particular, ILD should be the main therapeutic target. Therefore, despite some specificity for muscle and joint involvement, treatment of patients with ASS is guided by ILD severity and/or its initial response to treatment. However, no prospective comparative trial is yet available. Despite high use of steroids and a good initial response, >2/3 of patients with ASS-associated ILD will require at least one immunosuppressive drug during the course of their disease [5•, 9•]. This empirical approach is the result of recurrence, progressive deterioration, or the impossibility of tapering the steroids dosage. However, there have been no studies to determine when an immunosuppressive drug regimen should start, nor has there been a thorough comparison of the efficacy of the different drugs available. Finding answers to these questions should therefore be an objective of future prospective trials. Until now, the most commonly used treatments have included intravenous cyclophosphamide [68], mycophenolate mophetil [69], cyclosporine [70], or tacrolimus [71] (reviewed in Ref. [46]). There is some retrospective evidence of the therapeutic value of anti-CD20 for a limited number of refractory ASS ILD, similar to that shown for ASS myositis [72–74].

These medications should not be considered separately from respiratory rehabilitation and prevention of pulmonary infection.

Despite these available treatments, ILD or its acute or chronic complications (including infectious pneumonia, pulmonary hypertension, pneumothorax or pneumomediastinum, chronic respiratory failure) are the main cause of death in ASS. The overall mortality ratio for treated patients is significantly higher than the standardised mortality ratio for a population matched for age and sex [5•]. Long-term studies correlating ILD with death suggest a 40 % increase in mortality attributable to ILD [6, 57]. This observation should encourage clinicians to develop innovative treatments for ILD, especially for cases of rapid deterioration under treatment. Such innovative biotherapy could inhibit immune molecules (IFN- α and BAFF) known to be involved in ASS pathogenesis [18, 19]. Anti-TNF- α therapy should not be recommended because it is known to have a deleterious effect on myositis cases [75].

Rheumatic Manifestations

Prevalence and Clinical Range

The frequency of rheumatic manifestations varies widely among studies, ranging from 16 to 94 % depending on

definitions [2, 53]. The range of these manifestations is also broad. Polyarthralgia (usually mild and localised in the small joints) is the most frequent articular manifestation, whereas non-deforming polyarthritis and erosive and deforming polyarthritis [76, 77] are less common, seen in 16–17 % of cases [43, 57]. Because erosive polyarthritis is the most severe manifestation, careful evaluation is important. Regular tests should therefore be performed for rheumatoid factor and/or the presence of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; these have been found in some patients with ASS, defining a genuine overlap with rheumatoid arthritis [2, 40–42]. In these situations, or for patients with unresponsive disease, joint ultrasound and/or magnetic resonance imaging could be of value. In the absence of large dedicated studies, the severity of these rheumatic forms of ASS is difficult to predict and manage.

As described for other forms of inflammatory myositis and for SSc, periarticular calcifications are seldom reported in ASS (14–24 % of cases) [1, 43, 78]. When present, they may increase physical handicap.

Treatment

This heterogeneity makes it difficult to guide the choice of immunosuppressive drug. For ASS patients suffering from myositis or ILD, this choice is rarely based solely on severity of polyarthritis. Of the different immunosuppressive treatments, steroids and methotrexate are commonly used; most patients under these treatments achieve either total or partial remission. Anti-TNF- α s are not recommended [75].

Dermatology Manifestations

Mechanic's hands, defined as erythematous and fissured hyperkeratosis of the palmar or lateral edges of the fingers, are a classic dermatological sign of ASS. Although they may be difficult to distinguish from other lesions, for example eczema, occupational dermatomyositis, or other macular lesions encountered in dermatomyositis, mechanic's hands have been shown to be a highly specific diagnostic for ASS, especially clinically amyopathic ASS [79]. It is therefore important to search carefully for hyperkeratosis, as it may help establish a positive ASS diagnosis. The prevalence of this manifestation was, however, recently shown to be lower than previously reported (16–21 % in recent studies) [5•, 9•, 57]. Furthermore, its specificity should be re-evaluated, because mechanic's hands have also been associated with other myositides and connective tissue diseases [80], including anti-PM-Scl scleromyositis [81]. Although specific histological signs have been described, cutaneous biopsies are not essential. Mechanic's hands are exceptionally isolated and usually evolve in parallel with other ASS

manifestations [82]. No specific treatment, for example topical medication, is usually required, although it may be useful in some cases.

Other unspecific manifestations of different prevalence may be seen in ASS, and are characteristic of dermatomyositis (Gottron's papules and heliotrope rash, seen in approximately 20 % of cases; Table 1) or of SSc (sclerodactyly, telangiectasia [56]).

Raynaud's Phenomenon and Microvascular Disease

Raynaud's phenomenon, although unspecific, is another symptom associated with ASS. Raynaud's phenomenon is more commonly reported for patients with ASS (usually >50 % of cases [56]) than for other forms of myositides. This vasculopathy may be explained by direct activation, as observed in vitro, of endothelial cells by anti-Jo1 antibodies [83]. The severity of Raynaud's phenomenon varies between patients and may in some cases lead to digital ulcers [84]. Nail-fold capillaroscopy may reveal microvascular changes with a scleroderma pattern [85]. Although some studies have analysed the general prognostic value of these nail-fold changes for dermatomyositis [86–88], data evaluating the microvascular disease in ASS are largely absent [57]. Specific future studies should be performed and may help in evaluating targeted treatments, for example Bosentan (in association with courses of calcic inhibitors and/or iloprost), which has been shown to prevent digital ulcer recurrence in SSc [89].

Other Clinical Manifestations

Cardiac Manifestation

Although cardiac manifestations may occur in 11–50 % of ASS cases [11•, 39•, 43, 90, 91], none was initially described as part of ASS. Of those that occur, pericarditis, seen in up to 50 % of cases, seems the most frequent [11•], although its prevalence has not yet been systematically evaluated by any large study. It was recently suggested by a small study that this manifestation may be specifically associated with anti-PL7 positive ASS [11•]. For various myositides, heart involvement significantly reduced survival [92]. The severity of heart manifestations in ASS (tamponade or myocarditis being the worst), their response to specific treatments, and their effect on ASS prognosis still require detailed description.

Gastrointestinal Manifestations

Of the digestive manifestations (which are probably underestimated) oesophageal dysfunction is the most frequent, and includes dysphagia, aphagia, or—more commonly—

gastrointestinal reflux [61]. These manifestations can lead to severe complications and affect long-term prognosis [61]. They should be specifically investigated, especially for cases of severe and persistent involvement.

General Manifestations

Other reported manifestations include asthenia, weight loss, and fever. Fever is reported for up to 87 % of ASS patients [2], and is associated with active ASS and with acute and severe forms of ILD [53].

Overlapping Symptoms

In the first study of patients with ASS, Marguerie et al. [1] reported a significant prevalence of symptoms overlapping with SS or SSc (59 % and 72 %, respectively). Until recently, however, later studies had not systematically investigated this aspect of the disease. Although the frequency of patients presenting with clinical signs of SS or SSc may be quite high, confirmation of SS or SSc by serology markers is less common: 35 vs. 17 % and 28 vs. 5 %, respectively [5••]. Furthermore, patients rarely meet the defined classification criteria for primary SS and SSc [34].

Unlike the overlapping SS serology biomarkers (discussed above), the effect of these overlapping symptoms has rarely been studied. Although they do not seem to affect patient survival [5••], their potential effect on the patient's quality of life make them a worthy subject for investigation.

Association with Cancer

Cancer-associated inflammatory myopathies have been defined as the occurrence of cancer three years before or after diagnosis of the myositis [47]. The association of cancer with ASS remains controversial. Indeed, ASA have been shown to correlate both negatively and positively with cancer [39•, 57, 93]. At most, cancer may occur in 19 % of cases [39•]. Some cancer risk factors have been suggested, including anti-SSA-52 kDa and anti-Jo1, as compared with non-anti-Jo1 ASA. However, a recent large study comparing the incidence of cancer in ASS to the standardised incidence ratio reported no increased risk [5••]. These conflicting results may be related to the retrospective nature of existing studies, and larger epidemiological studies are therefore required to rigorously evaluate the global risk of cancer in ASS and its possible association with muscle involvement or specific serology biomarkers.

Conclusions and Perspectives

More than 20 years after it was first described, ASS remains a heterogeneous connective tissue disease. The organs involved

are numerous and diverse, and can vary from patient to patient or even for a single patient over time. The severity of this organ involvement is also quite variable. This heterogeneity makes it difficult to classify patients and to identify those who require early aggressive therapy, and very few prospective trials are available to guide the therapeutic management of patients with ASS. Future prospective clinical studies should therefore seek to provide further insight into characterisation of the disease, to find robust prognosis indicators. Such studies would be a preliminary tool for creating prospective therapeutic trials of more homogeneous and stratified cohorts of ASS patients, with the objective of validating conventional or innovative immunosuppressive therapy.

Because it is the main morbidity and mortality factor, particular attention should be paid to ILD. Evaluation of ILD requires systematic and repeated clinical, morphological and functional evaluations throughout patient follow-up. Such close monitoring will probably enable better management of immunosuppressive treatments, including earlier therapeutic changes when a treatment is insufficiently effective.

In addition to reducing mortality, improving morbidity is also an important objective for ASS management. ASS is a chronic disease, impairing locomotion (via muscular, articular, and respiratory mechanisms) and self-image (via skin disease and articular deformations) and causing chronic pain (via myalgia and arthralgia). ASS therefore probably has an important but underestimated effect on the patient's quality of life. Future studies evaluating this aspect of the disease would be of substantial value for assessing patient need, and for creating specific educative and psychosocial intervention.

Compliance with Ethics Guidelines

Conflict of Interest Baptiste Hervier declares that he has no conflict of interest.

Olivier Benveniste declares that he has no conflict of interest.

Human and Animal Rights and Informed Consent This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

- Of importance
- Of major importance

1. Marguerie C, Bunn CC, Beynon HL, Bernstein RM, Hughes JM, So AK, et al. Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Q J Med*. 1990;77:1019–38.
2. Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Dalakas M, Plotz PH, et al. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory

- myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine* (Baltimore). 1991;70:360–74.
3. Stone KB, Oddis CV, Fertig N, Katsumata Y, Lucas M, Vogt M, et al. Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum*. 2007;56:3125–31.
 4. Connors GR, Christopher-Stine L, Oddis CV, Danoff SK. Interstitial lung disease associated with the idiopathic inflammatory myopathies: what progress has been made in the past 35 years? *Chest*. 2010;138:1464–74.
 5. •• Hervier B, Devilliers H, Stanciu R, Meyer A, Uzunhan Y, Masseau A, et al. Hierarchical cluster and survival analyses of antisynthetase syndrome: phenotype and outcome are correlated with anti-tRNA synthetase antibody specificity. *Autoimmun Rev*. 2012;12:210–7. *Largest study of patients with ASS, revealing different clinical features among patients with ASS according to ASA specificity.*
 6. Marie I. Morbidity and mortality in adult polymyositis and dermatomyositis. *Curr Rheumatol Rep*. 2012;14:275–85.
 7. Labirua A, Lundberg IE. Interstitial lung disease and idiopathic inflammatory myopathies: progress and pitfalls. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22:633–8.
 8. Kang EH, Lee EB, Shin KC, Im CH, Chung DH, Han SK, et al. Interstitial lung disease in patients with polymyositis, dermatomyositis and amyopathic dermatomyositis. *Rheumatology* (Oxford). 2005;44:1282–6.
 9. •• Kalluri M, Sahn SA, Oddis CV, Gharib SL, Christopher-Stine L, Danoff SK, et al. Clinical profile of anti-PL-12 autoantibody. Cohort study and review of the literature. *Chest*. 2009;135:1550–6. *First large study of patients with anti-PL12-ASS, showing a low prevalence of ILD compared with historical studies of anti-Jo1 ASS.*
 10. Marie I, Josse S, Decaux O, Dominique S, Diot E, Landron C, et al. Comparison of long-term outcome between anti-Jo1- and anti-PL7/PL12 positive patients with antisynthetase syndrome. *Autoimmun Rev*. 2012;11:739–45.
 11. • Labirua-Iturburu A, Selva-O'Callaghan A, Vincze M, Dankó K, Vencovsky J, Fisher B, et al. Anti-PL-7 (anti-threonyl-tRNA synthetase) antisynthetase syndrome: clinical manifestations in a series of patients from a European multicenter study (EUMYONET) and review of the literature. *Medicine* (Baltimore). 2012;91:206–11. *Largest study of patients with anti-PL7-ASS suggesting their association with pericarditis.*
 12. Ascherman DP. Animal models of inflammatory myopathy. *Curr Rheumatol Rep*. 2012;14:257–63.
 13. Soejima M, Kang EH, Gu X, Katsumata Y, Clemens PR, Ascherman DP. Role of innate immunity in a murine model of histidyl-transfer RNA synthetase (Jo-1)-mediated myositis. *Arthritis Rheum*. 2011;63:479–87.
 14. Park SG, Kim HJ, Min YH, Choi E-C, Shin YK, Park B-J, et al. Human lysyl-tRNA synthetase is secreted to trigger proinflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:6356–61.
 15. Ascherman DP, Oriss TB, Oddis CV, Wright TM. Critical requirement for professional APCs in eliciting T cell responses to novel fragments of histidyl-tRNA synthetase (Jo-1) in Jo-1 antibody-positive polymyositis. *J Immunol*. 2002;169:7127–34.
 16. Chinoy H, Adimulam S, Marriage F, New P, Vincze M, Zilahi E, et al. Interaction of HLA-DRB1*03 and smoking for the development of anti-Jo-1 antibodies in adult idiopathic inflammatory myopathies: a European-wide case study. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:961–5.
 17. Eloranta M-L, Barbasso Helmers S, Ulfgrén A-K, Rönnblom L, Alm GV, Lundberg IE. A possible mechanism for endogenous activation of the type I interferon system in myositis patients with anti-Jo-1 or anti-Ro 52/anti-Ro 60 autoantibodies. *Arthritis Rheum*. 2007;56:3112–24.
 18. Krystufková O, Vallerskog T, Helmers SB, Mann H, Putová I, Beláček J, et al. Increased serum levels of B cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:836–43.
 19. Lundberg IE, Helmers SB. The type I interferon system in idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity*. 2010;43:239–43.
 20. Mimori T, Nakashima R, Hosono Y. Interstitial lung disease in myositis: clinical subsets, biomarkers, and treatment. *Curr Rheumatol Rep*. 2012;14:264–74.
 21. Fathi M, Barbasso Helmers S, Lundberg IE. KL-6: a serological biomarker for interstitial lung disease in patients with polymyositis and dermatomyositis. *J Intern Med*. 2012;271:589–97.
 22. Ihn H, Asano Y, Kubo M, Yamane K, Jinnin M, Yazawa N, et al. Clinical significance of serum surfactant protein D (SP-D) in patients with polymyositis/dermatomyositis: correlation with interstitial lung disease. *Rheumatology* (Oxford). 2002;41:1268–72.
 23. Wasieck CA, Reichlin M, Montes M, Raghu G. Polymyositis and interstitial lung disease in a patient with anti-Jo1 prototype. *Am J Med*. 1984;76:538–44.
 24. Mimori T, Imura Y, Nakashima R, Yoshifuji H. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathy: an update on clinical and pathophysiological significance. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19:523–9.
 25. Gunawardena H, Betteridge ZE, McHugh NJ. Myositis-specific autoantibodies: their clinical and pathogenic significance in disease expression. *Rheumatology* (Oxford). 2009;48:607–12.
 26. Koenig M, Fritzler MJ, Targoff IN, Troyanov Y, Sénécal J-L. Heterogeneity of autoantibodies in 100 patients with autoimmune myositis: insights into clinical features and outcomes. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:R78.
 27. Rönnelid J, Barbasso Helmers S, Storfors H, Grip K, Rönnblom L, Franck-Larsson K, et al. Use of a commercial line blot assay as a screening test for autoantibodies in inflammatory myopathies. *Autoimmun Rev*. 2009;9:58–61.
 28. Ghirardello A, Rampudda M, Ekholm L, Bassi N, Tarricone E, Zampieri S, et al. Diagnostic performance and validation of autoantibody testing in myositis by a commercial line blot assay. *Rheumatology* (Oxford). 2010;49:2370–4.
 29. Yamasaki Y, Yamada H, Nozaki T, Akaogi J, Nichols C, Lyons R, et al. Unusually high frequency of autoantibodies to PL-7 associated with milder muscle disease in Japanese patients with polymyositis/dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:2004–9.
 30. Targoff IN, Trieu EP, Plotz PH, Miller FW. Antibodies to glycyl-transfer RNA synthetase in patients with myositis and interstitial lung disease. *Arthritis Rheum*. 1992;35:821–30.
 31. Sato S, Kuwana M, Hirakata M. Clinical characteristics of Japanese patients with anti-OJ (anti-isoleucyl-tRNA synthetase) autoantibodies. *Rheumatology* (Oxford). 2007;46:842–5.
 32. Chinoy H, Lamb JA, Ollier WER, Cooper RG. Recent advances in the immunogenetics of idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:216.
 33. •• Chinoy H, Salway F, Fertig N, Shephard N, Tait BD, Thomson W, et al. In adult onset myositis, the presence of interstitial lung disease and myositis specific/associated antibodies are governed by HLA class II haplotype, rather than by myositis subtype. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R13. *This study shows for the first time correlations between the immune genetic susceptibility (eg. Human Leukocyte Antigen class I & II molecules) and the ASS clinical spectrum.*
 34. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:554–8.
 35. Rutjes SA, Vree Egberts WT, Jongen P, Van Den Hoogen F, Pruijn GJ, Van Venrooij WJ. Anti-Ro52 antibodies frequently co-occur with anti-Jo-1 antibodies in sera from patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Clin Exp Immunol*. 1997;109:32–40.

36. Stanciu R, Guiguet M, Musset L, Touitou D, Beigelman C, Rigolet A, et al. Antisynthetase syndrome with anti-Jo1 antibodies in 48 patients: pulmonary involvement predicts disease-modifying anti-rheumatic drug use. *J Rheumatol*. 2012;39:1835–9.
37. Váncsa A, Csipo I, Németh J, Dévényi K, Gergely L, Dankó K. Characteristics of interstitial lung disease in SS-A positive/Jo-1 positive inflammatory myopathy patients. *Rheumatol Int*. 2009;29:989–94.
38. La Corte R, Lo Mo Naco A, Locaputo A, Dolzani F, Trotta F. In patients with antisynthetase syndrome the occurrence of anti-Ro/SSA antibodies causes a more severe interstitial lung disease. *Autoimmunity*. 2006;39:249–53.
39. • Marie I, Hatron PY, Dominique S, Cherin P, Mouthon L, Menard J-F, et al. Short-term and long-term outcome of anti-Jo1-positive patients with anti-Ro52 antibody. *Semin Arthritis Rheum*. 2012;41:890–9. *Study of patients with ASS suggesting the link between anti-SSA/La 52 kDa and the occurrence of cancers*.
40. Park C-K, Kim T-J, Cho Y-N, Kim I-S, Lee H-J, Lee K-E, et al. Development of antisynthetase syndrome in a patient with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2011;31:529–32.
41. O'Neill TW, Maddison PJ. Rheumatoid arthritis associated with myositis and anti-Jo-1 antibody. *J Rheumatol*. 1993;20:141–3.
42. Cavagna L, Fusetti C, Montecucco C, Caporali R. Anticyclic citrullinated peptide antibodies as markers of erosive arthritis in antisynthetase syndrome. *J Rheumatol*. 2010;37:1967. author reply 1968.
43. Schmidt WA, Wetzel W, Friedländer R, Lange R, Sörensen HF, Lichey HJ, et al. Clinical and serological aspects of patients with anti-Jo-1 antibodies—an evolving spectrum of disease manifestations. *Clin Rheumatol*. 2000;19:371–7.
44. • Fernandez C, Bardin N, De Paula AM, Salort-Campana E, Benyamine A, Franques J, et al. Correlation of clinicoserologic and pathologic classifications of inflammatory myopathies: study of 178 cases and guidelines for diagnosis. *Medicine (Baltimore)*. 2013;92:15–24. *Histological study analysing retrospectively the pathological features of patients with myositides, including ASS, and showing a high prevalence of dermatomyositic pattern in patients with various ASA*.
45. Mozaffar T, Pestronk A. Myopathy with anti-Jo-1 antibodies: pathology in perimysium and neighbouring muscle fibres. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2000;68:472–8.
46. Aggarwal R, Oddis CV. Therapeutic approaches in myositis. *Curr Rheumatol Rep*. 2011;13:182–91.
47. Troyanov Y, Targoff IN, Tremblay J-L, Goulet J-R, Raymond Y, Sénécal J-L. Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84:231–49.
48. Váncsa A, Gergely L, Panyi A, Lakos G, Németh J, Szodoray P, et al. Myositis-specific and myositis-associated antibodies in overlap myositis in comparison to primary dermatomyositis: relevance for clinical classification: retrospective study of 169 patients. *Joint Bone Spine*. 2010;77:125–30.
49. • Oddis CV, Reed AM, Aggarwal R, Rider LG, Ascherman DP, Levesque MC, et al. Rituximab in the treatment of refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis: a randomized, placebo-phase trial. *Arthritis Rheum*. 2013;65:314–24. *Largest prospective trial of patients with myositides testing the clinical efficacy of anti-CD20 monoclonal antibodies on muscle recovery. This study revealed significant reduction of ASA titre after B cell depletion*.
50. Harris-Love MO. Safety and efficacy of submaximal eccentric strength training for a subject with polymyositis. *Arthritis Rheum*. 2005;53:471–4.
51. Alexanderson H, Lundberg IE. The role of exercise in the rehabilitation of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17:164–71.
52. Friedman AW, Targoff IN, Arnett FC. Interstitial lung disease with autoantibodies against aminoacyl-tRNA synthetases in the absence of clinically apparent myositis. *Semin Arthritis Rheum*. 1996;26:459–67.
53. Tillie-Leblond I, Wislez M, Valeyre D, Crestani B, Rabbat A, Israel-Biet D, et al. Interstitial lung disease and anti-Jo-1 antibodies: difference between acute and gradual onset. *Thorax*. 2008;63:53–9.
54. Watanabe K, Handa T, Tanizawa K, Hosono Y, Taguchi Y, Noma S, et al. Detection of antisynthetase syndrome in patients with idiopathic interstitial pneumonias. *Respir Med*. 2011;105:1238–47.
55. Fischer A, Swigris JJ, Du Bois RM, Lynch DA, Downey GP, Cosgrove GP, et al. Anti-synthetase syndrome in ANA and anti-Jo-1 negative patients presenting with idiopathic interstitial pneumonia. *Respir Med*. 2009;103:1719–24.
56. Mielnik P, Wiesik-Szewczyk E, Olesinska M, Chwalinska-Sadowska H, Zabek J. Clinical features and prognosis of patients with idiopathic inflammatory myopathies and anti-Jo-1 antibodies. *Autoimmunity*. 2006;39:243–7.
57. Dugar M, Cox S, Limaye V, Blumbers P, Roberts-Thomson PJ. Clinical heterogeneity and prognostic features of South Australian patients with anti-synthetase autoantibodies. *Intern Med J*. 2011;41:674–9.
58. Yoshifuji H, Fujii T, Kobayashi S, Imura Y, Fujita Y, Kawabata D, et al. Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity*. 2006;39:233–41.
59. Richards TJ, Eggebeen A, Gibson K, Yousem S, Fuhrman C, Gochoico BR, et al. Characterization and peripheral blood biomarker assessment of anti-Jo-1 antibody-positive interstitial lung disease. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2183–92.
60. Ingegnoli F, Lubatti C, Ingegnoli A, Boracchi P, Zeni S, Meroni PL. Interstitial lung disease outcomes by high-resolution computed tomography (HRCT) in Anti-Jo1 antibody-positive polymyositis patients: a single centre study and review of the literature. *Autoimmun Rev*. 2012;11:335–40.
61. Marie I, Josse S, Hatron PY, Dominique S, Hachulla E, Janvresse A, et al. Interstitial lung disease in anti-jo1 patients with antisynthetase syndrome. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012.
62. Goh NSL, Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, Copley SJ, Maher TM, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:1248–54.
63. MacDonald SL, Rubens MB, Hansell DM, Copley SJ, Desai SR, Du Bois RM, et al. Nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia: comparative appearances at and diagnostic accuracy of thin-section CT. *Radiology*. 2001;221:600–5.
64. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:646–64.
65. Yousem SA, Gibson K, Kaminski N, Oddis CV, Ascherman DP. The pulmonary histopathologic manifestations of the anti-Jo-1 tRNA synthetase syndrome. *Mod Pathol*. 2010;23:874–80.
66. Fathi M, Vikgren J, Boijesen M, Tylen U, Jorfeldt L, Tomling G, et al. Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis: longitudinal evaluation by pulmonary function and radiology. *Arthritis Rheum*. 2008;59:677–85.
67. • Hervier B, Meyer A, Dieval C, Uzunhan Y, Devilliers H, Launay D, et al. Pulmonary hypertension in antisynthetase syndrome: prevalence, etiology and survival. *Eur Respir J*. 2013. *This retrospective study shows that pulmonary hypertension is a severe complication of ASS-ILD, which must be better diagnosed*.
68. Yamasaki Y, Yamada H, Yamasaki M, Ohkubo M, Azuma K, Matsuoka S, et al. Intravenous cyclophosphamide therapy for progressive interstitial pneumonia in patients with polymyositis/dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46:124–30.
69. Hervier B, Masseau A, Mussini J-M, Audrain M, Hamidou MA. Long-term efficacy of mycophenolate mofetil in a case of refractory antisynthetase syndrome. *Joint Bone Spine*. 2009;76:575–6.

70. Jankowska M, Butto B, Debska-Slizień A, Rutkowski B. Beneficial effect of treatment with cyclosporin A in a case of refractory antisynthetase syndrome. *Rheumatol Int*. 2007;27:775–80.
71. Wilkes MR, Sereika SM, Fertig N, Lucas MR, Oddis CV. Treatment of antisynthetase-associated interstitial lung disease with tacrolimus. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2439–46.
72. Marie I, Dominique S, Janvresse A, Levesque H, Menard J-F. Rituximab therapy for refractory interstitial lung disease related to antisynthetase syndrome. *Respir Med*. 2012;106:581–7.
73. Sem M, Molberg O, Lund MB, Gran JT. Rituximab treatment of the anti-synthetase syndrome: a retrospective case series. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48:968–71.
74. Frikha F, Rigolet A, Behin A, Fautrel B, Herson S, Benveniste O. Efficacy of rituximab in refractory and relapsing myositis with anti-JO1 antibodies: a report of two cases. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48:1166–8.
75. Dastmalchi M, Grundtman C, Alexanderson H, Mavragani CP, Einarsdottir H, Helmers SB, et al. A high incidence of disease flares in an open pilot study of infliximab in patients with refractory inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:1670–7.
76. Meyer O, Charlanne H, Cherin P, Allanore Y, Coquerelle P, Grardel B, et al. Subluxing arthropathy: an unusual manifestation of the antisynthetase syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2009;68:152–3.
77. Oddis CV, Medsger Jr TA, Cooperstein LA. A subluxing arthropathy associated with the anti-Jo-1 antibody in polymyositis/dermatomyositis. *Arthritis Rheum*. 1990;33:1640–5.
78. Queiro-Silva R, Bañegil I, De Dios-Jiménez de Aberásturi JR, Belzunegui-Otano J, González-Beneitez C, Figueroa-Pedrosa M. Periarticular calcinosis associated with anti-Jo-1 antibodies sine myositis. Expanding the clinical spectrum of the antisynthetase syndrome. *J Rheumatol*. 2001;28:1401–4.
79. Yang C-J, Sheu C-C, Ou T-T, Hwang J-J, Huang M-S. Combined lung fibrosis and “mechanic’s hand”: a clinical diagnostic clue to amyopathic antisynthetase syndrome. *Respirology*. 2008;13:611–4.
80. Selva-O’Callaghan A, Labrador-Horrillo M, Solans-Laque R, Simeon-Aznar CP, Martínez-Gómez X, Vilardell-Tarrés M. Myositis-specific and myositis-associated antibodies in a series of eighty-eight Mediterranean patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum*. 2006;55:791–8.
81. Lega J-C, Cottin V, Fabien N, Thivolet-Béjui F, Cordier J-F. Interstitial lung disease associated with anti-PM/Scl or anti-aminoacyl-tRNA synthetase autoantibodies: a similar condition? *J Rheumatol*. 2010;37:1000–9.
82. Bachmeyer C, Tillie-Leblond I, Lacert A, Cadranet J, Aractingi S. “Mechanic’s hands”: a misleading cutaneous sign of the antisynthetase syndrome. *Br J Dermatol*. 2007;156:192–4.
83. Barbasso Helmers S, Englund P, Engström M, Ahlin E, Fathi M, Janciauskiene S, et al. Sera from anti-Jo-1-positive patients with polymyositis and interstitial lung disease induce expression of intercellular adhesion molecule 1 in human lung endothelial cells. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2524–30.
84. Hervier B, Lambert M, Hachulla E, Musset L, Benveniste O, Piette J-C, et al. Anti-synthetase syndrome positive for anti-isoleucyl-tRNA synthetase antibodies: an unusual case overlapping with systemic sclerosis and Sjogren’s syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50:1175–6.
85. Mercer LK, Moore TL, Chinoy H, Murray AK, Vail A, Cooper RG, et al. Quantitative nailfold video capillaroscopy in patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:1699–705.
86. Mugii N, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Horie S, Yahata T, et al. Association between nail-fold capillary findings and disease activity in dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50:1091–8.
87. Riccieri V, Vasile M, Macri V, Sciarra I, Stefanantoni K, De Luca N, et al. Successful immunosuppressive treatment of dermatomyositis: a nailfold capillaroscopy survey. *J Rheumatol*. 2010;37:443–5.
88. Selva-O’Callaghan A, Fonollosa-Pla V, Trallero-Araguás E, Martínez-Gómez X, Simeon-Aznar CP, Labrador-Horrillo M, et al. Nailfold capillary microscopy in adults with inflammatory myopathy. *Semin Arthritis Rheum*. 2010;39:398–404.
89. Matucci-Cerinic M, Denton CP, Furst DE, Mayes MD, Hsu VM, Carpentier P, et al. Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:32–8.
90. Hervier B, Uzunhan Y, Hachulla E, Benveniste O, Nunes H, Delaval P, et al. Antisynthetase syndrome positive for anti-threonyl-tRNA synthetase (anti-PL7) antibodies. *Eur Respir J*. 2011;37:714–7.
91. Hervier B, Wallaert B, Hachulla E, Adoue D, Lauque D, Audrain M, et al. Clinical manifestations of anti-synthetase syndrome positive for anti-alanyl-tRNA synthetase (anti-PL12) antibodies: a retrospective study of 17 cases. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:972–6.
92. Dankó K, Ponyi A, Constantin T, Borgulya G, Szegedi G. Long-term survival of patients with idiopathic inflammatory myopathies according to clinical features: a longitudinal study of 162 cases. *Medicine (Baltimore)*. 2004;83:35–42.
93. Chinoy H, Fertig N, Oddis CV, Ollier WER, Cooper RG. The diagnostic utility of myositis autoantibody testing for predicting the risk of cancer-associated myositis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:1345–9.
94. Sato S, Hirakata M, Kuwana M, Nakamura K, Suwa A, Inada S, et al. Clinical characteristics of Japanese patients with anti-PL-7 (anti-threonyl-tRNA synthetase) autoantibodies. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23:609–15.

« Power corresponds to the human ability not just to act but to act in concert »
Hannah Arendt
in Crises of the Republic. New York: Harcourt, Brace, Jovanovich éd, 1972.

Résumé

Les maladies auto-immunes (MAI) correspondent à un large ensemble de pathologies cliniquement hétérogènes, affectant le plus souvent des adultes jeunes, de façon volontiers chronique. Du point de vue physiopathologique, ces maladies correspondent à la survenue d'une rupture de tolérance au soi, dont les mécanismes sont complexes et font appel à l'ensemble des acteurs du système immunitaire. Si l'implication des cellules de l'immunité adaptative est largement documentée dans ce contexte, celle des cellules appartenant à l'immunité innée, comme les cellules Natural Killer (NK) est peu étudiée. A travers deux exemples de MAI systémiques, le Lupus Systémique (LS) et le Syndrome des Antisynthétases (SAS), l'objet de ce travail est de montrer l'implication des cellules NK au cours des MAI et d'étudier les mécanismes en cause.

L'étude phénotypique et fonctionnelle des cellules NK chez des patients présentant une MAI révèle de nombreuses anomalies comparativement aux sujets contrôles. Ces dernières sont plus marquées chez les patients en phase active plutôt qu'en rémission. De plus, l'infiltration des tissus cibles au cours du SAS par les cellules NK d'une part, et l'activation *in vitro* de ces cellules par les auto-antigènes au cours du LS d'autre part, confirme l'implication des cellules NK au cours de ces deux MAI. Par ailleurs, des interactions des cellules NK avec plusieurs types cellulaires impliqués dans l'immunopathologie de ces maladies semblent conditionner les anomalies observées. Ces dernières sont différentes selon la maladie étudiée : le profil des cellules NK des patients atteints de LS étant plutôt immature et tourné vers la production de cytokines, tandis que celui des patients atteints de SAS correspond à un stade de différenciation terminal mais hypofonctionnel.

L'ensemble des résultats suggère que les cellules NK participent à l'immunopathologie des MAI. Leur implication est conditionnée par l'effet de certains stimuli et certaines interactions cellulaires, qui sont de nature différente d'une MAI à l'autre.

Abstract

Auto-immune diseases (AID) form a broad spectrum of heterogeneous and chronic pathologies, most commonly affecting young adults. The etiopathogenesis of AID corresponds to a breakdown of the immunological tolerance: the result of complex mechanisms, implicating every component of the immune system. While adaptive immune cells has been extensively studied in this context, the role of innate immune cells, including Natural Killer (NK) cells, is much less understood. Using Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Antisynthetase Syndrome (ASS) as model pathologies, the main objective of this work is to demonstrate the involvement of NK cells in AID and to study the relevant mechanisms.

Patients with AID showed numerous anomalies in the phenotypical and functional analysis of their NK cells, as compared to healthy controls. These differences are more pronounced in active rather than inactive patients. Moreover, the infiltration of target tissues by NK cells in ASS as well as the activation of these cells by SLE specific auto-antigens confirm the involvement of NK cells in AID. Additionally, interactions of NK cells with different immune cells, known to be involved in AID pathogenesis, seem to be the cause of the observed anomalies. These anomalies differ among both AID: NK cells from patients with SLE are immature and devoted to cytokine production, whereas those from patients with ASS have reached a highly differentiated but hypofunctional stage.

Taken as a whole, these data suggest that NK cells are involved in the immunopathogenesis of AID. This involvement seems conditioned by the effect of different stimuli and different cellular interactions, which are distinct from one form of AID to another.